

Prävention der Bleomycin induzierten Lungenfibrose durch inhalative Applikation von Heparin oder Urokinase

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Des Fachbereichs Humanmedizin

Der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Friedemann, Norbert, Gregor, Ulrich Lübke

Aus Lüdenscheid

Gießen 2004

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin

Medizinische Klinik II

Leiter: Prof. Dr. med. W. Seeger

des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: PD. Dr. med. A. Günther

Gutachter: Prof. Dr. med. Lindemann

Tag der Disputation: 15.03.2005

Inhalt

1) Liste der Abkürzungen	1
2). Vorwort	2
3) Einleitung	3
4). Fragestellung	8
5) Materialien und Methoden	9
5.1.1) Substanzen	9
5.1.2) Geräte	10
5.2) Induktion der Lungenerkrankung/ Lungenfibrose durch inhalative	11
Verabreichung von Bleomycin	
5.3) Charakterisierung von Gasaustausch und der Lungenmechanik am	12
narkotisierten und maschinell beatmeten Tier	
5.4) Charakterisierung der pulmonalen Hämodynamik und der	13
Endothelpermeabilität an der isolierten ventilierten und blutfrei	
perfundierten Lunge.	
5.5) Durchführung der BAL und histologischen Begutachtung	16
5.6) Therapeutische inhalative Interventionen mit Heparin oder Urokinase	17
5.7) Messung des Hydroxiprolingehaltes des Gewebes und des löslichen	19
Kollagens	
5.8) Differentialzellbild und Proteingehalt der BAL sowie Blutbild des	19
peripheren Blutes, PCA	
6). Ergebnisse	20
6.1) Induktion einer Pneumonitis mit konsekutiver Entwicklung einer	20
Lungenfibrose durch inhalative Verabreichung von Bleomycin.	

6.2) Prävention der Entwicklung einer Lungenfibrose durch repetitive Inhalation mit Heparin oder Urokinase.	28
7) Diskussion	38
7.1) Methodische Aspekte des hier zur Anwendung gekommenen Modells der Bleomycin induzierten Pneumonitis und konsekutiver Fibrose	38
7.2) Therapie der Lungenfibrose mit inhalativ verabreichtem Heparin- oder Urokinase	43
7.3) Ausblick	46
8.1) Zusammenfassung	47
8.2) Summary	49
9) Literaturverzeichnis	51
10) Danksagung	59
11) Lebenslauf	60

1. Liste der Abkürzungen

ALI	acute lung injury
ARDS	acute respiratory distress syndrome
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BLM	Bleomycin
CT	Computertomographie
d	Tag
h	Stunde
HRCT	high resolution computedtomography
ILD	Interstitielle Lungenerkrankung
K _{fc}	kapillärer Filtrations Koeffizient
MW	Mittelwert
PAP	pulmonalarterielle Druck
PCA	Prokoagulatorische Aktivität
PEEP	positiver endexpiratorischer Druck
SEM	Standardfehler
u-PA	Urokinase

2. Vorwort

Die hier vorgelegte Arbeit ist das Ergebnis der, im Zeitraum von 1997-1999, unter Betreuung von Herrn PD. Dr. Günther durchgeführten Versuche an der Medizinischen Klinik der Justus-Liebig Universität Gießen. Sie beinhaltet erstens die Etablierung eines Modells einer ARDS-ähnlichen akuten Lungenschädigung mit nachfolgender Fibrose durch inhalative Bleomycin Applikation am Kaninchen, sowie zweitens die Überprüfung der Wirksamkeit einer inhalativen Applikation von Heparin oder Urokinase an diesem Modell.

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder Sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben die auf mündliche Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen, zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

3. Einleitung

Der fibrotische Umbau des zarten Alveolar-Gerüsts in eine verdickte, durch Alveolarkollaps und Bindegewebsbildung charakterisierte Gerüststruktur, die den Anforderungen des Gasaustausches und der Lungenmechanik nur unzureichend genügt, tritt regelmäßig im Gefolge interstitieller Lungenerkrankungen (ILD) auf. Deren Prävalenz beträgt nach neueren Untersuchungen 67,5 (Frauen) bzw. 80,9 (Männer)/100000 [COULTASS et al. (1994)]. Unter den hierzu zählenden 130 verschiedenen Entitäten fallen quantitativ vor allem die Idiopathische Pulmonale Fibrose (IPF, 22,5%) und die postinflammatorische Lungenfibrose (z.B. nach ARDS oder Pneumonie, 16,7%) ins Gewicht. Andere wesentliche Auslöser sind inhalierte Umwelttoxene (z.B. erhöhte Konzentration an Ozon oder Stickoxiden), Pharmaka wie das Zytostatikum Bleomycin und Bestrahlungen im Brustkorbbereich. Vor allem für die Subgruppe der IPF ist die Prognose nach wie vor sehr schlecht. Die Mehrzahl der Patienten zeigt trotz eines Behandlungsversuches mit Kortison alleine oder in Kombination mit Azathioprin oder Cyclophosphamid einen rapiden Progress der Erkrankung. Im Median leben die Patienten nur noch für einen Zeitraum von 28 Monaten nach Diagnosestellung [Schwartz et al. 1994]. Die bei der IPF zu Grunde liegenden Pathomechanismen sind trotz intensiver Bemühungen bislang nicht aufgeklärt. Ein initialer infektiöser Vorgang (z.B. virale Infektion) wird vermutet [American Thoracic Society Consensus Statement 2000], ohne dass diesbezüglich eindeutige Evidenzen existieren. Außerdem gibt es Fälle von familiär auftretenden Lungenfibrosen mit unterschiedlich ausgeprägter Penetranz, die ein ausschließlich infektiös-entzündlich getriggertes Geschehen als unzureichenden Erklärungsansatz erscheinen lassen [American Thoracic Society Consensus Statement 2000]. In jedem Fall und unbeschadet des letztlich verantwortlichen Triggermechanismus scheint das Geschehen aber in eine unkontrolliert ablaufende Fibrosierungsreaktion einzumünden, mit einer anhaltenden Aktivierung vor allem von Transforming Growth Factor (TGF)- β , aber

auch anderer Wachstumsfaktoren wie Platelet Derived Growth Factor (PDGF) [EICKELBERG et al. (2001)]. Über die Frage einer entzündlichen Reaktion als zu Grunde liegender und die Fibrosierungsreaktion unterhaltender Mechanismus existiert momentan ebenso wenig Klarheit wie über die Frage der wesentlich daran beteiligten Zellpopulationen (außer der Fibroblasten) [SELMAN et al. (2002)]. Der Auf- und Abbau der extrazellulären Matrix unterliegt sowohl unter physiologischen wie auch unter pathophysiologischen Bedingungen einer engen Regulation [NAGASE et al. (1999)]. Als abbauende Enzyme stehen hierbei die Matrix-Metalloproteinasen (MMP), hier vor allen MMP 1, 8, 13 (Kollagenasen), 2 (Gelatinase A), 7 (Matrilysin) und 9 (Gelatinase B) im Vordergrund, die durch die endogen vorhandenen Inhibitoren (TIMP 1 – 4) in ihrer Wirkung begrenzt werden [NAGASE et al. (1999)]. Beachtung haben in der Vergangenheit vor allem die Gelatinasen A und B (MMP 2 und 9) erfahren, da sie Kollagen IV spalten können und von Fibroblasten und dem Alveolarepithel (MMP 2) bzw. inflammatorisch kompetenten Zellen (MMP 9) exprimiert werden können [SUGA et al. (2000)]. In klinischen Studien wurde beobachtet, dass MMP 9 vor allem bei IPF Patienten mit einem UIP (*usual interstitial pneumonitis*) – typischen Befund, MMP 2 hingegen bei Patienten mit NSIP (*non specific interstitial pneumonitis*) und BOOP (*bronchiolitis obliterans organizing pneumonia*) [SUGA et al. (2000); LEMJABBAR et al. (2000)] hochreguliert wird. Bei Patienten mit Emphysem wurde hingegen eine ausgeprägte Induktion der Expression von MMP 1 in alveolären Typ II Zellen beobachtet [IMAI et al. (2001)]. Völlig unklar ist gegenwärtig allerdings der Stellenwert einer solchen vermehrten Expression von Matrix-Metallo-Proteasen bei interstitiellen Lungenerkrankungen. Einerseits scheint sie Voraussetzung für die Transmigration inflammatorisch kompetenter Zellen [GIBBS et al. (1999)] und von Fibroblasten in den Alveolarraum und damit der intraalveolären Ausbreitung der Fibrose [SUGA et al. (2000)] zu sein, andererseits sind auch Reparationsvorgänge wie z.B. die Migration sich erholender Bronchialepithelien [LEGRAND et al. (1999)] wie auch der Abbau überschüssiger Matrix per se von der Präsenz der MMP

abhängig. In diesem Zusammenhang erscheinen jüngere Beobachtungen erwähnenswert, in denen gezeigt werden konnte, dass erstens im Bleomycin Modell der Lungenfibrose bei MMP 9 *knock out* Mäusen im Vergleich zum *wild type* zwar die Bronchiolisierung weitgehend ausbleibt, das Ausmaß der Fibrose allerdings identisch ist. Zweitens scheinen bei Patienten mit einer IPF die Inhibitoren der MMP (TIMP1-4) in möglicherweise noch weit größerem Umfang hochreguliert zu werden als die MMP selbst, so dass diese Imbalance zwischen MMP und TIMP zu Gunsten der TIMP letztlich verantwortlich für die dauerhafte Deposition von kollagenhaltiger Extrazellulärmatrix ist [SELMAN et al. (2000)].

Über diese Zusammenhänge hinaus wurden auch weitreichende Veränderungen des pulmonalen Surfactant-Systems bei Patienten mit interstitiellen Lungenerkrankungen und hier vor allem der IPF beschrieben [Mc CORMACK et al. (1991), CHAPMAN et al. (1986), GÜNTHER et al. (1999)]. Hierbei zeigen sich bei der IPF ähnlich schwerwiegende Surfactantveränderungen wie beim ARDS: es findet sich eine Reduktion des relativen Gehaltes der unter physiologischen Bedingungen dominierenden Phospholipide Phosphatidylcholin und Phosphatidylglycerol, ein starker Abfall des Palmitoylierungs- und vor allem des Dipalmitoylierungsgrades des Phosphatidylcholins sowie ein massiver Abfall des relativen Anteils der hydrophoben Surfactant Apoproteine SP-B und SP-C wie auch des hydrophilen Surfactant Apoproteins SP-A. Als Ausdruck dieser vielschichtigen biochemischen Veränderungen konnte in allen bislang durchgeführten Studien ein ausgeprägter Verlust der oberflächenspannungssenkenden Funktion des Surfactant dargestellt werden. In der Konsequenz bedeutet dies eine deutlich erhöhte Kollapsneigung der betroffenen Alveolarbezirke.

Ein weiterer wesentlicher Mechanismus der gestörten Surfactantfunktion ist die Inhibition der Surfactantfunktion durch Plasmaproteine. Von besonderer Bedeutung erscheint in diesem Zusammenhang die alveoläre Fibrinbildung, da hierbei eine Inkorporation aller hydrophoben Surfactantkomponenten in das Fibringerüst stattfindet und eine Depletion der alveolären

Grenzfläche von nahezu allen Surfactantkomponenten bewirkt [GÜNTER et al. (1994), SEEGER et al. (1993)]. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl bei akut inflammatorischen wie auch bei chronisch interstitiellen Lungenerkrankungen im alveolären Kompartiment eine erhebliche Verschiebung des hämostaseologischen Gleichgewichtes zu Gunsten der Gerinnung stattfindet. Es sind vor allem die durch Alveolarmakrophagen synthetisierten und durch "*membrane shedding*" an das Mikro-Milieu abgegebenen Faktoren des extrinsischen Gerinnungspfad (also *tissue factor* und F VII) [NAKSTADT et al. (1987), IDELL et al. (1989), IDELL et al. (1991), GÜNTHER et al. (2000a), GÜNTHER et al. (2000b)], die diese Verschiebung induzieren. Erschwerend findet sich eine verminderte Aktivität fibrinolytischer Faktoren, da außer einer Reduktion des Gehaltes an Urokinase (dem prädominanten Plasminogenaktivator des Alveolarraumes) ein Anstieg von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) sowie von $\alpha 2$ -Antiplasmin beobachtet werden kann [IDELL et al. (1989), IDELL et al. (1991), GÜNTHER et al. (2000b)]. Die Polymerisation von Fibrinogen zu Fibrin in Gegenwart pulmonalen Surfactants bewirkt in vitro aufgrund der Inkorporation der Surfactantkomponenten eine Steigerung der Surfactant-inhibitorischen Kapazität des Fibrinogens um mindestens zwei Zehnerpotenzen [SEEGER et al. (1993)]. In Übereinstimmung hiermit lassen sich an isoliert perfundierten und ventilierten Lungen gesunder Kaninchen massive Störungen des Gasaustausches allein durch sequentielle inhalative Applikation von Fibrinogen und Thrombin induzieren [SCHERMULY et al. (2001)].

Auch außerhalb der pulmonalen Strombahn findet in der Lunge unter akut-entzündlichen Bedingungen ein gesteigerter Fibrinumsatz statt, mit im Vordergrund stehender Ablagerung von Fibrinpolymeren im alveolären Kompartiment. Die Entstehung dieser „hyalinen Membranen“ belegt eine Verschiebung der hämostaseologischen Balance zu Gunsten der prokoagulatorischen Seite im entzündlich veränderten alveolären Kompartiment. Für einige akut-inflammatorische Erkrankungsbilder sind diese im extravasa-alveolären Raum

auf tretenden Veränderungen detailliert analysiert worden. Es zeigten sich zum Teil massiv erhöhte Aktivitäten des TF und des F VII [NAKSTADT et al. (1987); IDELL et al. (1991); SEEGER et al. (1991); GÜNTHER et al. (2000a); GÜNTHER et al. (2000);] sowie erhöhte Spiegel an PAI-1 und α -2-Antiplasmin [IDELL et al. (1991); GÜNTHER et al. (2000); BERTOZZI et al. (1990)], bei gleichzeitiger Reduktion der Konzentrationen an u-PA [GÜNTHER et al. (2000); BERTOZZI et al. (1990)].

Wie bereits oben erwähnt, das therapeutische Angebot für Patienten mit progredient verlaufenden interstitiellen Lungenerkrankungen ist derzeit sehr beschränkt und reduziert sich im wesentlichen auf Steroide und Immunsuppressiva wie Cyclophosphamid oder Azathioprin, ohne dass hierüber gegenwärtig kontrollierte Studien vorlägen. Selbst im Fall einer Ansprache der Erkrankung auf dieses Therapieregime, was keinesfalls selbstverständlich ist und z.B. bei IPF Patienten die Ausnahme darstellt, ist in den meisten Fällen nur eine Stabilisierung des Krankheitsgeschehens auf dem aktuellen Status quo erzielbar. Erkauft wird dies mit den langfristigen Folgen einer solchen Therapie, wie z.B. erhöhte Infektanfälligkeit und Steroid-induzierter Diabetes, Osteoporose und Myopathie. In der jüngeren Vergangenheit sind alternative Ansätze entwickelt und präklinisch sowie auch in ersten klinischen Studien bei IPF Patienten eingesetzt worden. Zu ihnen gehören Interferon γ , das über STAT-1 direkt antiproliferative Effekte ausübt (Phase III Studie gerade abgeschlossen), Pirfenidon, das die Kollagendeposition unterbinden soll (Phase II Studie), Acetylcystein, welches das alveoläre Glutathion Gleichgewicht beeinflussen soll (Phase III Studie), Bosentan, das als dualer Endothelin-Rezeptor-Antagonist ebenfalls antifibroproliferativ wirken soll (Phase I/II Studie in Giessen), und Sildenafil, ein Phosphodiesterase 5 Inhibitor (Studien in Giessen). Darüberhinaus gibt es derzeit keine weiteren etablierten oder in der klinischen Prüfung stehenden therapeutischen Konzepte und Perspektiven. Es besteht somit ein dringender Bedarf an der Entwicklung zusätzlicher Therapiekonzepte.

4.Fragestellung

- Gelingt es durch inhalative Bleomycinapplikation beim Kaninchen eine akute inflammatorische Lungenschädigung zu induzieren und geht diese ARDS ähnliche Phase in eine fibroproliferative Spätphase über?
- Welche Parameter eignen sich zur Charakterisierung des Krankheitsverlaufs?
- Wie stellt sich das Verteilungsmuster des geschädigten Lungenparenchyms, bei inhalativer Bleomycingabe dar? Ist eine homogene Verteilung zu beobachten?
- Ist es möglich den Verlauf der Erkrankung durch inhalative Heparin- oder Urokinasegabe zu beeinflussen?
- Ist hierbei eine frühe Intervention (inhalative Heparin/ u/PA Gabe zu einem frühen Zeitpunkt) oder ein spätes Therapieregime erfolgreicher?

5.) Materialien und Methoden

5.1.1) Substanzen

Atemgasgemisch: CO₂ 4%, O₂ 16,5%, N₂ 79,5% (Messer Griesheim)

Enrofloxacin: Baytril (Bayer)

Bleomycina Almirall (Grupo Farmacéutico Almirall, S. A.)

Elektrolytlösung (Serag-Wiesner)

Formalinlösung 4% gepuffert (Apotheke des Uni-Klinikum-Gießen)

Glukose 5% (Braun)

Ketamin: Ketanest® (Park-Davis)

Liquimin N 25000® (Hoffmann-La Roche)

NaCl 0,9% (Braun)

Natriumhydrogenkarbonat 8,2% (Braun)

Sauerstoff 4.5 (Messer Griesheim)

Xylazinhydrochlorid: Rompun® (Bayer)

Urokinase: Actosolv® (Behring)

Xylokain® 2% (Astra Chemicals)

5.1.2) Geräte

Atemmaske Plexiglas (Eikemeyer)

Beatmungspumpe „Cat/Rabbit Ventilator 6025” (Hugo Sachs Elektronik)

Druckaufnehmer „Singel Use Pressure Transducer” (Braun)

Endobronchialtubus Broncho-Cath™ left 39 ch (Mallinckrodt MEDICAL)

?- Counter Markus Kohstall 42548 Ramona

Oesophagus-Katheter (Jäger GmbH)

Peristaltikpumpe „Masterflex” (Cole-Palmer)

Portasonic I® Ultraschall Vernebler (MMAD 2.5µm, Devillbiss, Langen)

Pulmosonic® Ultraschall Vernebler (MMAD 2.7µm)

Pyrogentestboxen (Plaslab Schweiz)

Tracheal- Tubus 3.0 Oral/Nasal (Mallinckrodt MEDICAL)

Tintenstrahldrucker „Deskjet 500” (Hewlett-Packard)

Verstärker „PlugSys-DBA” (Hugo-Sachs)

Wägezelle „U1-G” (Hottinger-Baldwin-Meßtechnik)

Wärmepumpe „Thermomix UB”+„Frigomix” (Braun)

5.2) Induktion der Lungenerkrankung/Lungenfibrose durch inhalative Verabreichung von Bleomycin

Gesunde „White New Zealand Rabbits“ beiderlei Geschlechts wurden im Alter von 5-7 Monaten eine Woche vor Versuchsbeginn mit Baytril® antibiotisch vorbehandelt. Am Tag der Induktion der Pneumonitis wurde den Tieren ein venöser Zugang über die Ohrrendvene gelegt und die Narkose mit einem Gemisch aus Ketanest® (~60mg/kg KG)/Rompun® (~22mg/kg KG) eingeleitet. In tiefer Anästhesie folgte die intratracheale Intubation und nachfolgend die kontrollierte maschinelle Beatmung der Tiere (Hubvolumen 30ml, 30 x/min mit einem PEEP von 1cm H₂O). Anschließend lagerten wir die Tiere in einen Abzug in eine für Kaninchen physiologische Körperhaltung um. Dort wurde die inhalative Bleomycinapplikation durchgeführt (1.8U Bleomycin /kg KG). Zu diesem Zweck wurde in den inspiratorischen Schenkel des Ventilationssystems, ein Portasonic® Ultraschallvernebler (MMAD 2.5µm, Devilbiss, Langen, Deutschland) zuschaltbar eingebaut. Dieser Vernebler zeigte unter den eingestellten Beatmungsparametern einen linearen Zuwachs an generiertem Aerosol pro Zeiteinheit. Durch Messung der pulmonalen Dyspositionsrate von ⁹⁹Tc markierter Bleomycinlösung wurde die zeitabhängige pulmonale Wirkstoffabgabe definiert. Entsprechend erfolgte dann die Körpergewichts bezogene Verabreichung des Bleomycins über die Dauer der Vernebelung. Orientierende Versuche mit 2,4 und 2,0 U/kg KG Bleomycin erwiesen sich als zu toxisch (Die Mehrzahl der Tiere verstarb in den ersten 4 Tagen post exposition), so dass die schließlich hier gewählte Dosis von 1,8 U/kg KG Bleomycin die Schwellendosis zu einem letalen Verlauf darstellt. Im Anschluss an die Deposition wurde die Anästhesie beendet, die Tiere nach Einsetzen der Spontanatmung extubiert und in für diese Zwecke im Abzug vorbereitete Käfige isoliert. Nach Ablauf von 48

Stunden erfolgte der Rücktransport in den Tierstall. Die Tiere erhielten unter Fortsetzung der antibiotischen Behandlung Futter und Wasser ad libidum.

Als Kontrollgruppe wurden Kaninchen des selben Alters und beiderlei Geschlechts exakt der gleichen Behandlung wie bei den oben angeführten Kaninchen unterzogen. Bei den Kontrolltieren (n=20) wurde anstatt Bleomycin lediglich NaCl (0,9%) vernebelt.

5.3) Charakterisierung von Gasaustausch und der Lungenmechanik am narkotisierten und maschinell beatmeten Tier

Am Tag 4 (n=7), 8 (n=5), 16 (n=6), 24 (n=6), 32 (n=7), und 64 (n=5) nach der Bleomycin Exposition wurden die Tiere erneut über einen venösen Zugang, wie oben beschrieben, mit Ketanest[®] /Rompun[®] narkotisiert, endotracheal intubiert und in tiefer Narkose ein Röntgenbild des Thorax und ein HRCT der Lunge in Endinspiration angefertigt. Anschließend wurde die Narkose weiter vertieft und ein Katheter in die rechte Arteria Carotis zur arteriellen Blutentnahme gelegt. In Lokalanästhesie wurde die Trachea freipräpariert, eine Trachealkanüle eingebunden und mit einer kontrollierten maschinellen Beatmung, mit einem Hubvolumen von 6,5ml/kg KG und einer Frequenz 30x/min, sowie einem FiO₂ 0,21 begonnen. Nach 5 Minuten wurde aus dem arteriellen Katheter Blut zur Blutgasanalyse (Radiometer Copenhagen) entnommen. Der arterielle pCO₂ lag bei der Kontrollgruppe bei 45,2 mmHg und es konnte kein signifikanter Unterschied zu den mit Bleomycin behandelten Tieren gesehen werden. Zur Messung der statischen Compliance wurde den Tieren eine transösophageale Druckmesssonde gelegt, die Sedation vertieft und die Beatmung auf reinen Sauerstoff (FiO₂=1) umgestellt, um die Tiere ausreichend zu präoxigenieren. Nach 5 Minuten wurde erneut ein arterieller Astrup zur Bestimmung des respiratorischen Quotienten

(p_{aO_2}/F_{iO_2}) abgenommen, die Lunge von der Beatmung abgekoppelt und somit eine spontane Expiration erreicht. Anschließend wurde über eine an einen Motor gekoppelte Glasspritze (Hamilton, Deutschland), mit definiertem und kontinuierlichem Fluss (120ml/min) Luft über den Inspirationsschenkel bis zu einem maximalen inspiratorischen Druck von 25mmH₂O zugeführt und anschließend wieder unter denselben Bedingungen entzogen, bis der Atemwegsdruck wieder 0 mmH₂O erreichte. Während dieses Manövers lief eine kontinuierliche Aufzeichnung aller Parameter (Zeit, Volumen, intrapulmonaler- und intrathorakaler Druck). Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt.

Aus den erhaltenen Werten ließ sich die Druck-Volumen-Kurve erstellen. Es wurden jeweils drei Kurven übereinander gelegt und gemittelt. Aus dem linearen Bereich des Expirationsschenkels wurde dann die statische Compliance errechnet.

5.4) Charakterisierung der pulmonalen Hämodynamik und der Endothelpermeabilität an der isolierten ventilierten und blutfrei perfundierten Lunge

Im Anschluss an die Durchführung der Compliancemesung wurden weitere Untersuchungen an der isolierten, ventilierten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge, durchgeführt [SEEGER (1986); GRIMMINGER (1988); SEEGER (1995); SEEGER (1994)]. Hierzu erfolgte zunächst eine großflächige Mobilisation der gesamten Bauchhaut und deren Ablösung von der darunter liegenden Muskulatur. Nun wurde im epigastrischen Winkel eine Laparotomie durchgeführt und das Abdomen durch Inzision der Bauchdeckenmuskulatur entlang der Rippenbögen und durch Spaltung des Muskulus rectus abdominis weiträumig freigelegt. Zur besseren Darstellung des Diaphragmas wurde der Processus xyphoideus mit

einer Klemme nach ventral gezogen. Durch Ablösung des Zwerchfells von der Thoraxapertur konnte der Pleuraraum eröffnet werden und eine mediale Sternotomie ohne Gefährdung der Herz-Lungen-Apparates durchgeführt werden. Der Thymus wurde stumpf abpräpariert, das Perikard eröffnet und sowohl die Aorta als auch die Pulmonalarterie mit einem Faden unterfahren und locker umschlungen.

Nach Durchführung dieser Präparationsschritte wurde der Raumluft ca. 4% CO₂ zugesetzt. Unmittelbar darauf wurde eine Inzision auf Höhe der Ausflussbahn des rechten Ventrikels durchgeführt, der mit 4° C gekühltem Perfusionsmedium gefüllte Katheter (Innendurchmesser 3 mm) in die Pulmonalarterie eingeführt und mittels der vorher eingelegten Umschlingung durch Knotung befestigt. Auf diese Weise wurde ein Eindringen von Luft in den pulmonalarteriellen Kreislauf verhindert. Der Perfusionsflow betrug zum Zeitpunkt der Einbindung 10 ml/min. Zur Vermeidung einer Druckbelastung der Lungenstrombahn wurde direkt nach der Knotung die Herzspitze eröffnet und die Aorta mit dem zuvor positionierten Faden legiert. Nun erfolgte die Entnahme des Herz-Lungen-Präparates nach Mobilisierung der Trachea von der hinteren Thoraxwand und stumpfer Abpräparation des Organpaketes nach distal. Schließlich erfolgte die Durchtrennung von Ösophagus, Vena Cava inferior und den verbleibenden Bindegewebssträngen. Bei dem Organpräparat konnte nun extrathorakal zum Schließen der artifiziellen Zirkulation ein Katheter in den linken Ventrikel eingebracht werden, welcher mit einer intramuralen Tabaksbeutelnaht fixiert wurde. Das linke Herzhorn, als mögliches störendes Flüssigkeitsreservoir, wurde nahe der Ventrikelwand abgebunden.

Die für die Präparation benötigte Zeit betrug ca. 30 Minuten. Sie wurde unter kontinuierlicher Perfusion und Ventilation durchgeführt.

Die Lunge wurde mit Hilfe einer Schlauch-Peristaltikpumpe mit pulsierendem Fluß perfundiert. Der Perfusionskreislauf konnte alternierend aus zwei unabhängigen Vorratsbehältern mit je 500 ml Volumen gespeist werden. Zur Vermeidung von arteriellen Embolien mußte das Perfusat einen Pall-Filter (Porenweite 40 µm) und eine Blasenfalle

passieren. Der Zufluß erfolgte über den in die Arteria Pulmonalis eingebrachten Katheter. Der venöse Abfluß, nach Passage der Lungenstrombahn des Perfusionsmediums, lief über den in den linken Ventrikel durch Tabaksbeutelnaht eingebundenen Katheter. Das abströmende Perfusat wurde über ein leiterförmiges Kaskadensystem in die Vorratsbehälter zurückgeleitet. Dieses Kaskadensystem machte es möglich, durch Verschluß einzelner Sprossen den hydrostatischen Druck auf das pulmonale Gefäßsystem zwischen 0 und 10 cm Wassersäule (Bezugspunkt Lungenhilus) zu variieren.

Das Herz-Lungen-Paket wurde zur kontinuierlichen Registrierung des Gewichtes an einer elektrischen Wägezelle in einem gasdichten Äquilibrierungsgefäß aufgehängt. Die Perfusatsgefäße bestanden aus doppelwandigem Glas, sie wurden über eine Thermopumpe mit Temperierflüssigkeit durchströmt, wodurch eine Temperaturkontrolle der Perfusionsgefäße und die Temperatursteuerung des Perfusats möglich war.

Die Temperatur des Perfusats betrug bei Einbindung 4°C, der Flow 10 ml/min. Nach Freispülen des Präparates von Blut wurde der Kreislauf geschlossen, das System auf 37°C erwärmt und der Flow auf 120 ml/min innerhalb von 20 Minuten erhöht. Es befanden sich insgesamt 250 ml Perfusat im geschlossenen Kreislauf, der pH lag zwischen 7,35 und 7,38. Der links ventrikuläre Druck wurde auf 2,0 mmHg, gemessen auf der Höhe des Hilus, eingestellt. Der PEEP betrug 1 cm H₂O bei allen Versuchen.

Nach einer 20 minütigen „steady state“ Phase, begann der Versuch der isolierten Lunge mit der Durchführung einer Bestimmung des Kapillären Filtrationskoeffizienten (K_{fc}) als Parameter der Gefäßpermeabilität und der vaskulären Compliance. Hierzu wurde der pulmonal venöse Druck für 8 Minuten um 10 cm H₂O angehoben und die pulmonale Gewichtsentwicklung gemessen. Anschließend erfolgten zwei alveoläre Hypoxiephasen über je 10 Minuten, bei diesen wurde die isolierte Lunge anstatt mit einem Gasgemisch mit 40% O₂ mit 3% O₂ beatmet. Dadurch kam es zu einer Vasokonstriktion welche über die kontinuierliche

Pulmonale arterielle Druckmessung dokumentiert wurde. Zum Abschluß erfolgte noch einmal die Bestimmung des Kapillären Filtrationskoeffizienten.

5.5) Durchführung der BAL und histologische Begutachtung

Nach Beendigung dieses Versuchs wurde der linke Hauptbronchus in Endinspiration mit einem Faden umschlungen und abgebunden. Es folgte eine Lavage des rechten Lungenflügels mit 3 mal 30 ml isotoner Kochsalzlösung mit anschließender Umschlingung und Abbindung auch des rechten Hauptbronchus und der rechten Pulmonalarerie in Höhe der Bifurkation.

Nach Zellpledetion (siehe unten) wurde die Lavageflüssigkeit für weitere Analysen aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

Nach Abtrennung des rechten Lungenflügels distal der Abbindung wurden die makroskopisch sichtbaren Bronchien und Bronchioli entfernt und der Rest homogenisiert, um die Hydroxiprolin Bestimmung durchführen zu können [BERG (1982)].

Nun erfolgte die Perfusionsfixierung der linken in Endinspiration legierten Lungenhälfte indem sie mit 4% Formalinlösung über den arteriellen Schenkel des Perfusionssystems mit einem Druck von 25 cm H₂O über 20 Minuten durchspült wurde. Anschließend wurden die Gefäße abgetrennt und die Lunge in 4% Formalinlösung eingelagert.

Die so fixierten Präparate wurden dann später in Paraplast plus (Sigma, München Deutschland) eingebettet, in 4µm dicke Scheiben geschnitten und auf Objektträger aufgetragen. Diese Präparate wurden nach standardisierter Technik einer Hämatoxilin-/Eosin Färbung unterzogen.

5.6) Therapeutische inhalative Interventionen mit Heparin oder Urokinase

Das hier entwickelte Behandlungsregime einer repetitiven Inhalation von humaner u-PA, beziehungsweise unfractioniertem Heparin, basierte auf denen in der Einleitung detaillierten Vorbefunden einer nahezu vollständigen Inaktivierung des Surfactant durch eine alveoläre Fibrinbildung. In Vorversuchen wurde dieses Behandlungskonzept entwickelt. Um möglichst größere Nähe zur klinischen Realität zu wahren und zur Vermeidung repetitiver Intubationen wurden alle therapeutischen Inhalationen unter Spontanatmung durchgeführt. Hierzu wurden die Kaninchen in Pyrogentestboxen (Plaslab, Schweiz) platziert und bekamen einen dichtabschließenden Trichter auf die Schnauze aufgesetzt. Das Aerosol wurde über einen doppelumigen Tubus zugeführt. Das andere Lumen diente zur Expiration und war mit einem Ventil versehen, welches keine Inspiration zuließ.

In Vorversuchen am gesunden Kaninchen wurde unter Verwendung dieses Systems diejenige Dosis an Heparin austitriert, die gerade unterhalb der Dosis liegt, die zu einer signifikanten Verlängerung der PTT im Plasma führt. Es wurde unter Verwendung dieser Heparindosis (ca. 3500 U) auch die Wirkdauer einer solchen Verabreichung getestet. Jeweils 12, 24 beziehungsweise 48 h nach inhalativer Verabreichung dieser Dosis wurden bronchoalveoläre Lavagen durchgeführt und die Rekalzifizierungszeit der mit Na Citrat versetzten Lavageflüssigkeit ermittelt. Bei diesen Vorversuchen war eine Heparinwirkung ansatzweise auch noch nach 48 h nachweisbar. Daher erfolgten alle therapeutischen Interventionen (auch die mit u-PA) im zweitägigen Abstand.

Bezüglich der inhalativen Verabreichung von uPA, war an der isolierten Kaninchenlunge bereits im Vorfeld diejenige u-PA Dosis identifiziert worden (ca. 6000 U), die eine Induktion einer alveolaren Fibrinolyse ohne begleitende Schrankenstörung erzielte [SCHERMULY (2001)]. Es traten keine systemischen Wirkungen oder pulmonalen Komplikationen auf.

Zur orientierenden Überprüfung ob tatsächlich die Fibrinbildung als solche wesentlich für die Entwicklung der Lungenfibrose verantwortlich ist, wurde sowohl ein „frühes“ (d 2, 4, 6, 8, 10, 12) wie auch ein „spätes“ (d 14, 16, 18, 20, 22, 24) Behandlungsschema entwickelt.

Die mit Bleomycin und frühem Heparin-Schema behandelten Kaninchen (n=7) erhielten eine totale Heparindosis von $45000 \pm 1500\text{U}$ (MW \pm SEM). Die Vernebelung dauerte pro Sitzung 25 Minuten. Die pulmonale Deposition wurde durch ^{99}TC ermittelt und betrug $3510 \pm 117\text{U}$ pro Vernebelung.

Die mit Bleomycin und spätem Heparin-Schema behandelten Kaninchen (n=7) erhielten eine totale Heparindosis von $45800 \pm 1500\text{U}$ (MW \pm SEM). Die Vernebelung dauerte pro Sitzung ebenfalls 25 Minuten. Die pulmonale Deposition betrug $3572 \pm 117\text{U}$ pro Vernebelung.

Die mit Bleomycin und frühem Urokinase-Schema (Actosolv®) behandelten Kaninchen (n=5) erhielten eine totale Urokinasedosis von 337000 ± 1360 Einheiten (MW \pm SEM). Vorversuche ergaben, daß durch die Vernebelung einen Wirkungsverlust der Urokinase von 75% auftrat, dieser Verlust wurde durch Einsatz entsprechend höherer Mengen an u-PA kompensiert. Die Vernebelung dauerte im Durchschnitt pro Sitzung 16,5 Minuten. Die pulmonale Deposition betrug 6319 ± 26.5 aktive Einheiten pro Vernebelung.

Die mit Bleomycin und spätem Urokinase-Schema (Actosolv®) behandelten Kaninchen (n=7) erhielten eine totale Urokinasedosis von 353300 ± 630 Einheiten (MW \pm SEM). Die Vernebelung dauerte im Durchschnitt pro Sitzung ebenfalls 16,5 Minuten. Die pulmonale Deposition betrug 6889 ± 12.3 Einheiten pro Vernebelung.

Am 28ten Tag post Bleomycin erfolgte bei den therapierten Tieren wie auch bei den mit Kochsalz „behandelten“ Kontrolltieren (n=11) der selbe Untersuchungsvorgang wie unter 5.3 und 5.4 beschrieben.

5.7) Messung des Hydroxprolingehaltes des Gewebes und des löslichen Kollagens in der BAL

Die Bestimmung des löslichen Kollagens in der BAL erfolgt mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Tests (Sir Col Kit)

Der Kollagen-Gehalt von homogenisiertem Gewebe erfolgte durch Bestimmung des Hydroxyprolins in Anlehnung an die Methode von Berg et al (1982) erfolgen. Dazu wird zunächst eine Hydrolyse der Proben (6N HCl für 16h bei 116°C) durchgeführt, der eine Komplexbildung des vorher zu Pyrrol oxidierten Hydroxyprolins mit p-Dimethylamonibenzaldehyd nachgeschaltet ist. Bei 560 nm kann unter Verwendung von Standards der Hydroxyprolingehalt der Proben bestimmt werden.

5.8) Differentialzellbild und Proteingehalt der BAL sowie Blutbild des peripheren Blutes, PCA

Die Lavage wurde sofort bei 4°C für 10 Minuten bei 300 x g zentrifugiert um ein Zellsediment zu erreichen. Die Zellen wurden dann gezählt werden und einem „cyto spin maneuver“ [LOHMEYER et al. (1999)] unterzogen. Die Färbung des Zytospin Präparates erfolgte nach der Methode nach Papenheim.

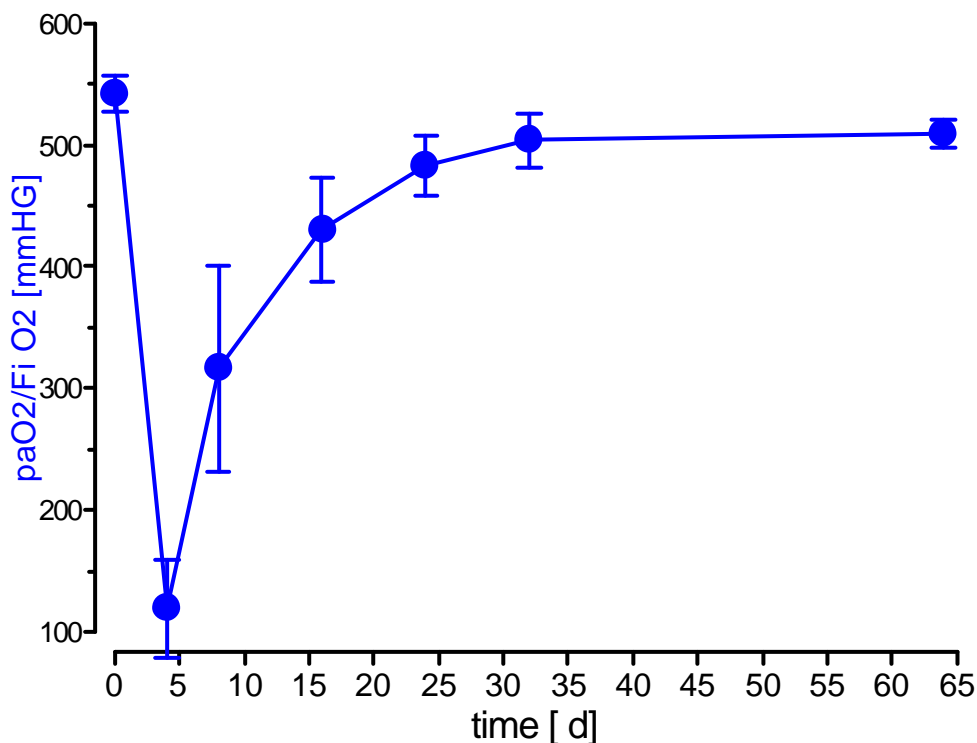
Außerdem wurde die prokoagulatorische Aktivität der BAL wie vorbeschrieben ermittelt [GÜNTHER et al. (2000)].

6) Ergebnisse

6.1) Induktion einer Pneumonitis mit konsekutiver Entwicklung einer Lungenfibrose durch inhalative Verabreichung von Bleomycin

4-8 Tage nach inhalativer Verabreichung von 1,8U Bleomycin entwickelte sich eine schwerste Pneumonitis. Es kam zu einer schweren Störung des Gasaustausches mit einem Abfall des $\text{paO}_2/\text{FiO}_2$ von 550mmHG in der Kontrollgruppe auf ca. 120mmHG am vierten Tag nach Bleomycinverabreichung (Abb 1). Zu diesem Zeitpunkt war bei den Tieren eine massive Tachypnoe und Zyanose zu beobachten. Zwei der sieben Tiere aus der Gruppe starben unter der Narkoseeinleitung vor der Intubation. Als Todesursache ist eine Hypoxie anzunehmen. Spätestens am 24. Tag konnte allerdings eine weitreichende Normalisierung des Gasaustausch beobachtet werden (Abb. 1).

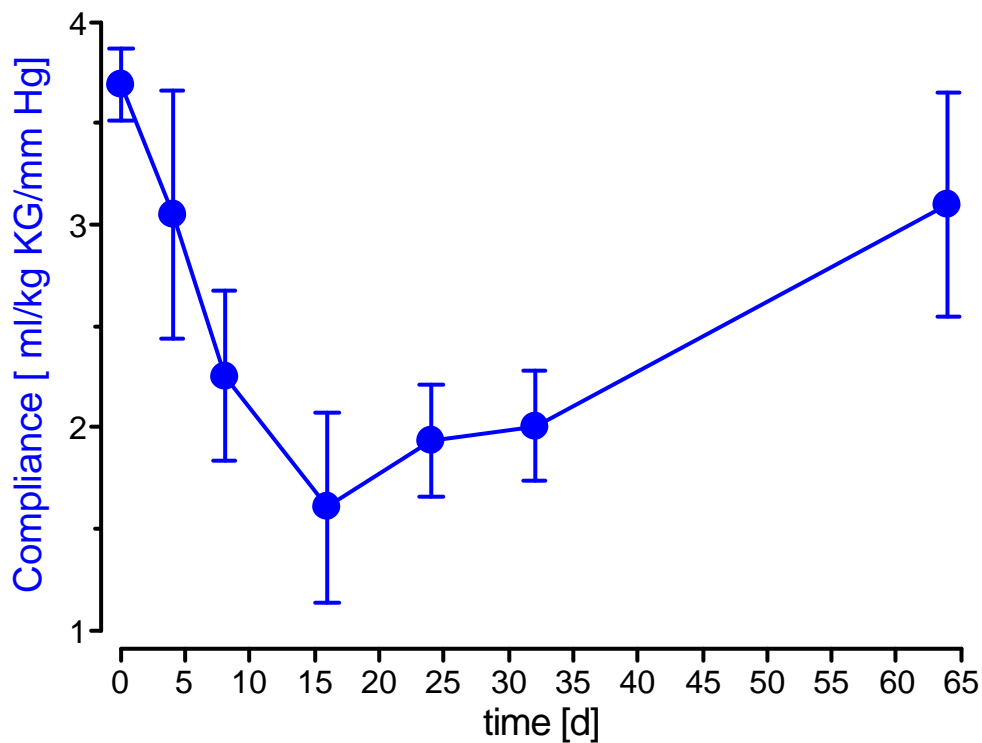
Abbildung 1



Zeitlicher Ablauf des Oxidationsindex ($\text{paO}_2/\text{FiO}_2$), beobachtet unter maschineller Beatmung zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der inhalativen Bleomycinbehandlung. Unbehandelte Kontrolltiere wurden an den Zeitpunkt 0 gesetzt. MW \pm SEM wurden jeweils angegeben.

Die Vernebelung von 1.8U Bleomycin/Kg b.w. bewirkte außerdem einen zunehmenden Verlust der statischen Compliance, mit einer, wenn auch im Vergleich zum Verlauf des $\text{paO}_2/\text{FiO}_2$, langsameren Kinetik. Bei den Kontrollgruppen lag die statische Compliance bei MW 3.8 ml/kg K.G.. Die niedrigsten Compliance Werte wurden am 16. Tag nach der Bleomycin Verneblung beobachtet und betrugen $< 50\%$ der Kontrolle (Abb. 2).

Abbildung 2

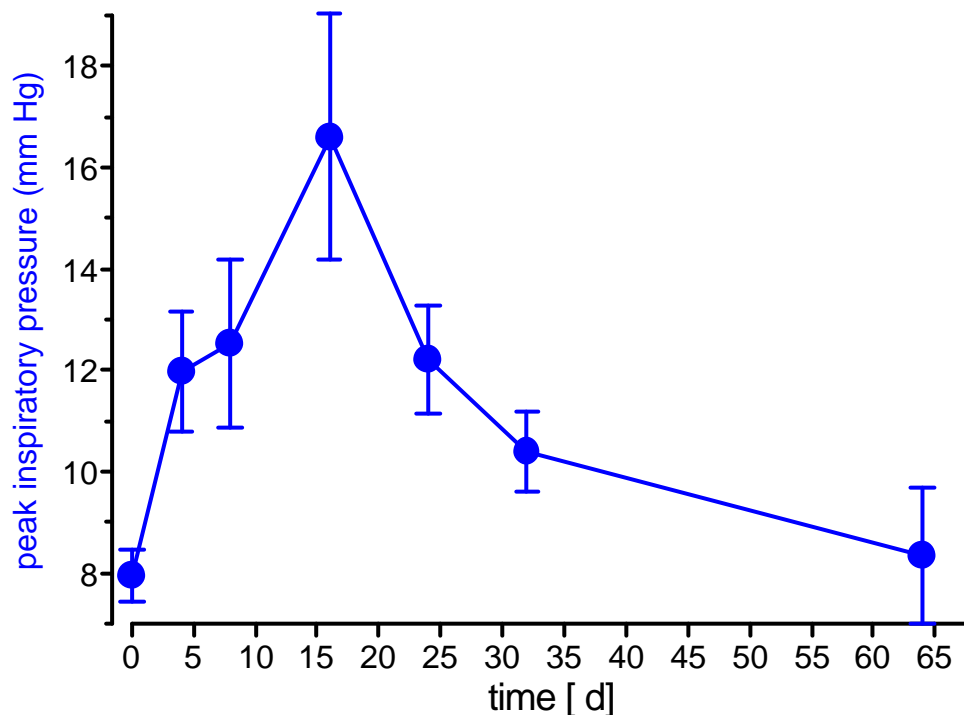


Zeitlicher Ablauf der statischen Lungencompliance beobachtet unter maschineller Beatmung zu den einzelnen Zeitpunkten nach der Bleomycinvernebelung. Unbehandelte Kontrolltiere wurden an den Zeitpunkt 0 gesetzt. MW \pm SEM wurden jeweils angegeben.

In den folgenden Tagen wurde auch bezüglich der Compliance eine leichte Besserung beobachtet, jedoch war diese auch noch nach dem 64 Tag mit ca. MW. 3.0 ml/kg K.G. im Vergleich zu den Kontrollen noch immer deutlich erniedrigt (Abb.2). Hierzu passend konnte ein Anstieg des inspiratorischen Spitzendrucks, welcher während der Volumen-kontrollierten maschinellen Beatmung gemessen wurde, beobachtet werden (Abb. 3). Der Spitzendruck

stieg ebenfalls am vierten Tag signifikant an und zeigte ebenfalls eine maximale Erhöhung am 16. Tag nach Bleomycin Vernebelung. Er normalisierte sich fast vollständig gegen Ende der 64 tägigen Beobachtungszeit (Abb. 3)

Abbildung 3



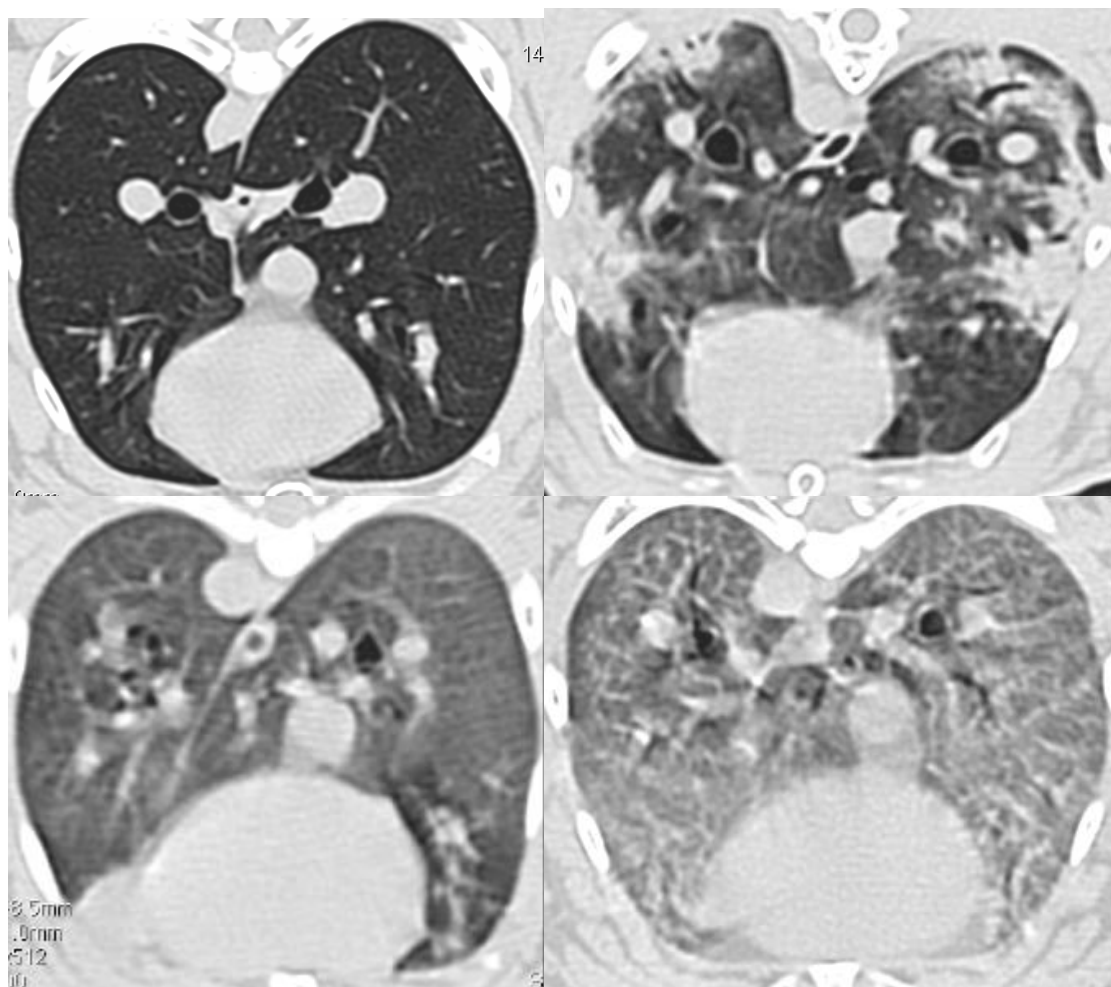
Zeitlicher Ablauf des Beatmungsspitzen Druckes, beobachtet unter maschineller Beatmung zu den einzelnen Zeitpunkten nach der Bleomycinvernebelung. Unbehandelte Kontrolltiere wurden an den Zeitpunkt 0 gesetzt. MW \pm SEM wurden jeweils angegeben.

Bei den histologischen Untersuchungen der Lungen zeigte sich ein mit den übrigen Befunden kongruentes Bild. Vom vierten bis zum 16ten Tag waren alveoläre und peribronchioläre Leukozyteninfiltrate zu sehen. Es bestand ein alveoläres Exsudat, Atelektasen/Dystelektasen und der Eindruck von hyalinen Membranformationen. Beginnend mit dem 16ten und sicher ab dem 24ten Tag nach der Bleomycininhalation, war ein fibrinöser Umbau der Lunge zu beobachten. Dieses drückte sich hauptsächlich in einer Zunahme der Anzahl intraalveolärer Fibroblasten und auch einer vermehrten Ablagerung von Extrazellulärmatrix im interstitiellen Raum aus (Abb. 5). Ab 24. Tage post Bleomycin dominierte das Bild einer zusätzlichen Kapillarisation in Verbindung mit einer weiterhin ausgeprägt fibrotischen Reaktion. Diese bestand unverändert am 32ten Tag und war in allen Lungenarealen homogen, mit einer

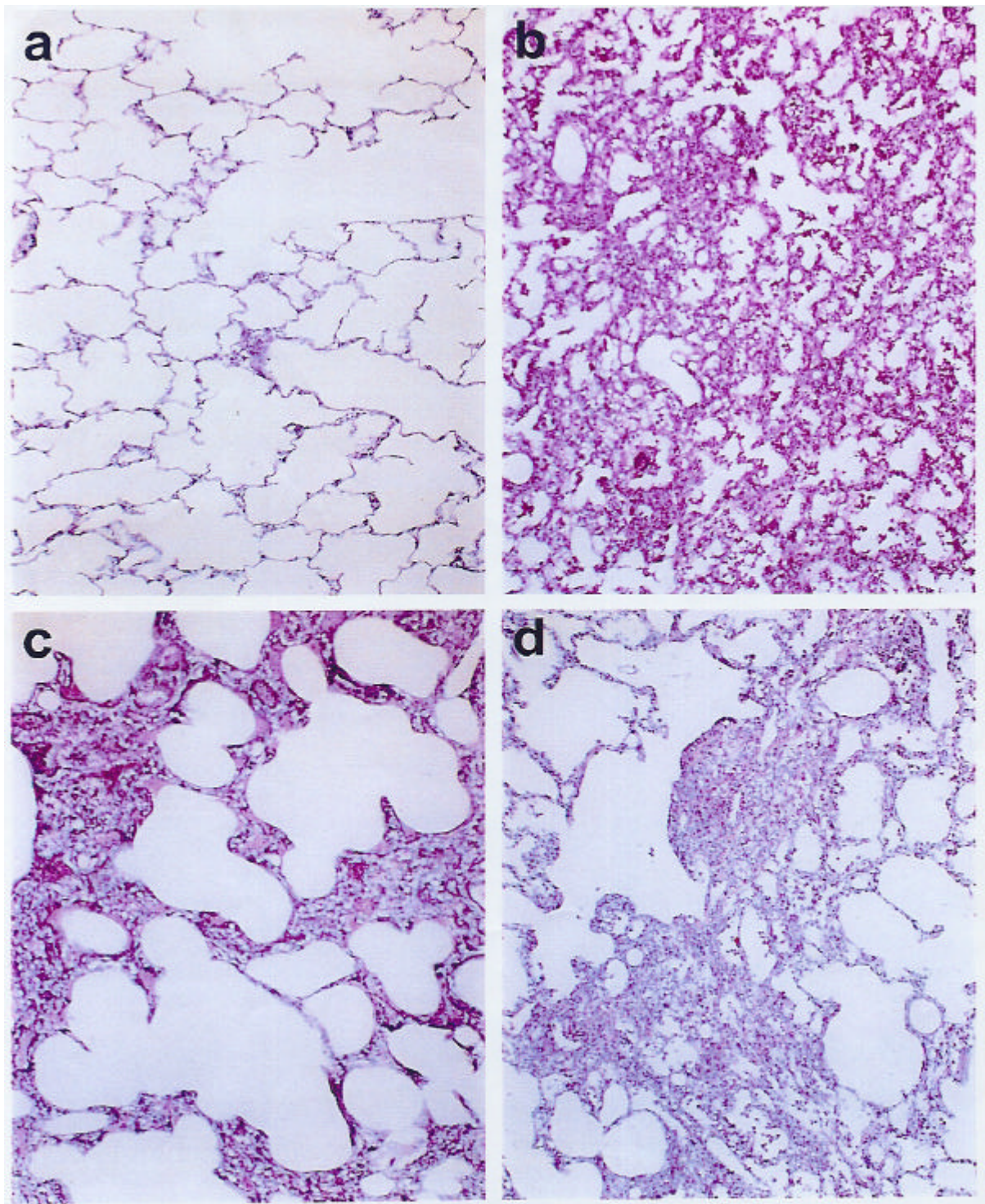
leichten Betonung der basalen Anteile, nachweisbar. 64 Tage nach Bleomycinverneblung waren nur noch geringe residuelle Veränderungen zu beobachten.

Die im Verlauf angefertigten HRCT des Thorax (exemplarisch in Abb. 4 dargestellt) zeigten 4-8 Tage nach Bleomycinverabreichung ausgeprägte und konfluierende Konsolidierungen und intraalveoläre Infiltrate. Etwa um den 24. Tag herum dominierte das Bild einer die ganze Lunge betreffenden Milchglastrübung, die im weiteren Verlauf in das fibrosetypische retikuläre Zeichnungsmuster (Maximum um den 28. bis 32. Tag) überging (Abb. 4).

Abbildung 4



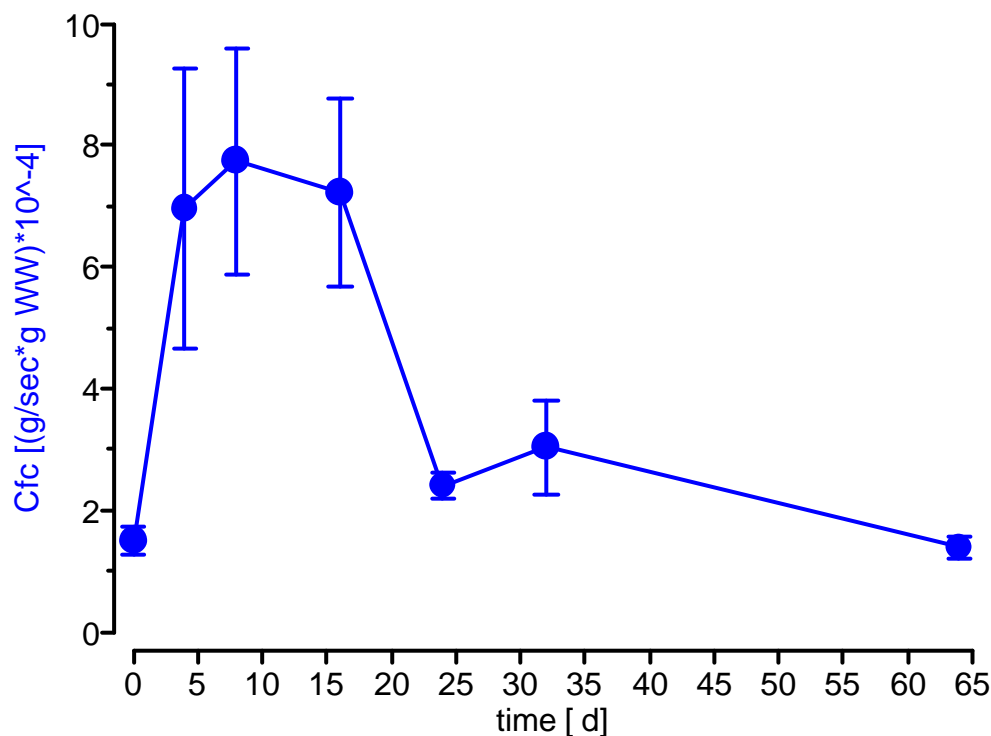
High resolution Computertomografie Schnitte von Kaninchenlungen. Obere Reihe links: Kontrolle, rechts 4 Tage nach Bleomycin Behandlung; Zweite Reihe, links: 24 Tage nach Bleomycin Behandlung, rechts: 32 Tage nach Bleomycin Behandlung. In allen Abbildungen werden die basalen Lungenabschnitte gezeigt, HRCT Scans wurden in Endinspiration durchgeführt.

Abbildung 5

Histologische Veränderungen im zeitlichen Verlauf nach Bleomycinbehandlung. Lungengewebe wurde in Formalin durch Perfusion der Pulmonalen Gefäße, bei einem konstanten Druck bei 25cmH₂O in Endinspiration, fixiert. Es wurden Hämatoxylin-/Eosinfärbungen angefertigt. a – unbehandelte Kontrolle, b – Bleomycin behandelte Lunge am Tag 4, c – Bleomycin behandelte Lunge am Tag 24 und d – Bleomycin behandelte Lunge am Tag 32. a – d: 100x vergrößert.

Der kapillare Filtrations Koeffizient (Kfc), welcher im perfundierten und ventilierten Lungenversuch erhoben wurde und einen Ausdruck für die Gefäßperabilität darstellt, war ab dem 4ten Tag deutlich erhöht und normalisierte sich wieder zum 24ten Tag (Abbildung 6).

Abbildung 6



Zeitlicher Verlauf des Kapillären filtrations Druckes (Kfc), beobachtet an der isolierten und perfundierten Lunge zu den einzelnen Zeitpunkten nach der Bleomycinvernebelung. Unbehandelte Kontrolltiere wurden an den Zeitpunkt 0 gesetzt. MW \pm SEM wurden jeweils angegeben.

Wie die Tabelle 1 zeigt, kam es von 4-8 Tag zu einem maximalen Anstieg der eosinophilen und neutrophilen Granulocyten. Diese Werte normalisierten sich im Vergleich zu der Kontrollgruppe am 24ten Tag.

Parallel dazu fiel ein Proteinfluß in das alveolare Kompartiment auf. Das Maximum der Proteinwerte bestand zwischen dem 8ten und 16ten Tag. Es nahm dann zum 24ten Tag ab, normalisierte sich jedoch nie, in dem von uns untersuchten Zeitraum, bis zum 64ten Tag.

Tabelle 1:**Proteingehalt und Differentialzellbild in der BAL**

	n	Protein mg/ml	Zellen [10 ⁶ /ml]	Lymphoz. [%]	Neutrophile [%]	Eosinophile [%]	AM [%]
Control	10	0.25±0.07	22,66±6,29	2,0±0,4	3,0±1,0	1,83±0,3	95,4±0,7
4d	5	1.18±0.29	29,47±7,2	9,6±2,5	8,215,1	20,8±4,4	60,8±3,2
8d	6	2.48±0.53	58,5±38,4	10,2±2,9	8,316,3	20,2±7,9	60,5±4,4
16d	6	2.68±0.6	54,21±16,3	3,7±1,1	17,5110,4	13,9±6,2	74,0±9,5
24d	6	0.85±0.13	45,62±22,5	3,0±0,6	2,010,0	8,6±2,9	87,2±3,3
32d	6	0.77±0.13	86,7±22	1,7±0,2	2,011,0	4,0±1,1	92,0±2,6
64d	5	0.86±0.44	28,94±7,3	2,4±0,9	1,010,0	2,0±1,0	95,0±2,3

§ - Dargestellt werden die MW ± SE vom Gesamteiweiß und der Zellzahl einschließlich des Differentialzellbildes ausgezählt nach Papenheimfärbung.

Lösliches Kollagen in der BAL und der Hydroxyprolingehalt, Indikatoren für ein fibroproliferatives Geschehen als Antwort auf die Bleomycinbehandlung, stiegen einige Tage nach der Vernebelung an. Das Maximum bestand am 16ten Tag und das lösliche Kollagen baute sich anschließend wieder ab. Nicht so beim Hydroxyprolingehalt, bei welchem ein Plateau bis zum Ende des Beobachtungszeitraums fortbestand (Tabelle2).

Die prokoagulative Aktivität der BAL stieg um den ca. 20fachen Wert an. Der höchste Wert lag am achten Tag nach der Bleomycin Behandlung. Im weiteren Verlauf normalisierten sich die Werte fast komplett (Tabelle 2).

Tabelle 2:**Lösliches Kollagen and prokoagulative Aktivität in BAL and Hydroxyprolingehalt im Lungenhomogenisat §**

	n	lösliches Kollagen [µg/ml]	PCA [U/ml] x10 ³	Hydroxyprolin [µg/mg Gewebe]
Control	15	1.1± 0.4	0.54±0.43	3.6±0.8
4d	5	5.6±2.1	7.36±3.69	5.5±0.6
8d	6	18.8±2.6	10.78±9.8	5.2±0.4
16d	6	38.3±12.5	4.72±2.88	7.0±1.5
24d	6	13.4±1.4	0.47±0.15	6.5±1.1
32d	6	13.1±2.6	0.51±0.02	7.2±0.8
64d	5	7.0±2.2	0.7±0.18	6.7±1.4

§ - Dargestellt werden die MW ± SE des Löslichen Kollagen, die prokoagulative Aktivität (PCA) in BAL and Hydroxyprolingehalt im Lungenhomogenisat

Diese oben beschriebenen Parameter, welche für ein akutes, inflammatorisches und exsudatives Geschehen sprechen, standen nicht im Einklang mit den im Blutbild und Differential Blutbild erhobenen Parametern (Tabelle 3). Dort waren zu keinem Zeitpunkt signifikante Veränderungen zu sehen.

Tabelle 3:
Leukozyten, Erythrozyten, Thrombozyten, Hämoglobin im Blut[§]

	n	Leukozyten [giga/l]	Erythrozyt en [tera/l]	Hämoglobin [g/dl]	Hämatokrit [%]	Thrombozyten [giga/l]
Control	15	6.22±0.35	5.8±0.1	11.4±2.1	36.9±0.7	442±34
4d	5	6.10±0.51	5.2±0.6	10.5±1.1	33.7±3.5	488±53
8d	6	5.74±0.52	5.7±0.2	11.6±0.5	37.5±1.0	452±33
16d	6	4.83±0.82	5.9±0.2	11.7±0.6	38.1±1.1	462±39
24d	6	6.82±0.87	5.9±0.2	12.0±0.6	38.6±0.9	405±44
32d	6	5.97±0.73	6.1±0.1	12.5±0.2	39.3±0.8	376±36
64d	5	6.36±0.67	6.9±0.1	13.5±0.2	43.1±0.7	342±26

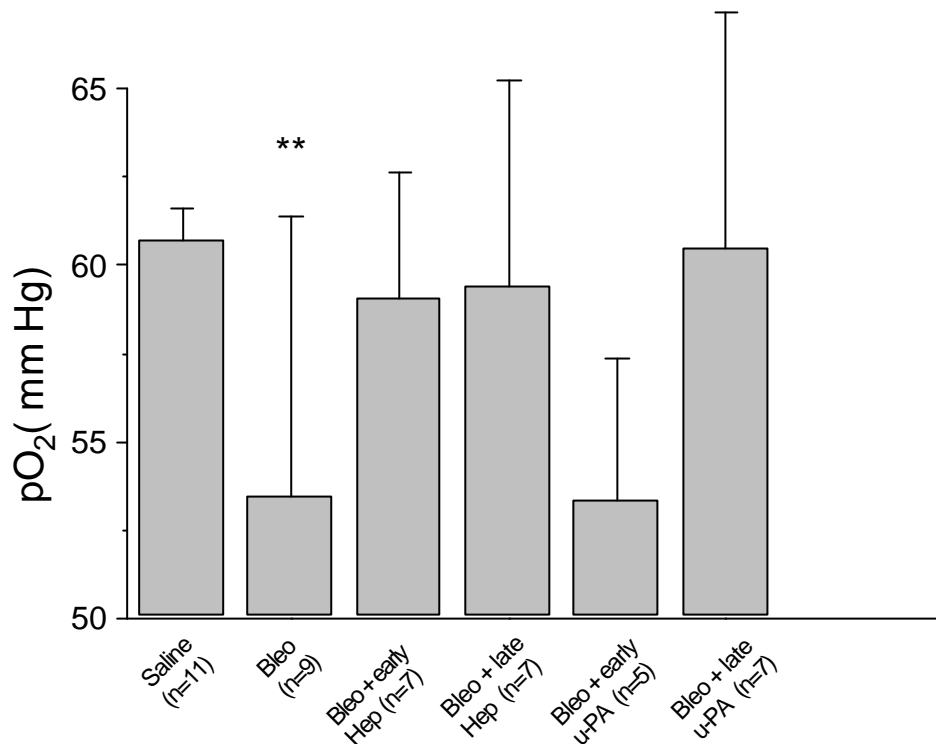
[§] - Dargestellt werden die MW 1SE von den gezählten Leukozyten, Erythrozyten, Thrombozyten und Hämoglobin - und Hämatokritwerten im Blut.

6.2) Prävention der Entwicklung einer Lungenfibrose durch repetitive Inhalation mit Heparin oder Urokinase

Aufgrund der in 6.1 angeführten Ergebnisse der Modellentwicklung und der hierbei nachweisbaren Maximalausprägung fibrotischer Veränderungen zwischen dem 24. und 32. Tag, wurde der 28. Tag post Bleomycin als Endpunkt für die Überprüfung fibrinolytischer Effekte gewählt. Wie im Methodenteil deklariert, wurden vier verschiedene Therapieansätze überprüft. Diese beinhalten die repetitive inhalative Verabreichung von unfractioniertem Heparin, beziehungsweise humaner Urokinase in der ARDS-typischen frühen (d 2,4,8, 10,12) beziehungsweise der Fibrose-typischen späten (d 14, 16, 18, 20, 22, 24) Phase der Bleomycin induzierten Pneumonitis. Bei keinem Tier bestand weder direkt noch indirekt ein Hinweis für eine Induktion einer Blutung durch die therapeutischen Agenzien. Alle solcherart behandelten Tiere überlebten den 28 tägigen Beobachtungszeitraum.

In den hier präsentierten Tabellen und Graphiken sind die durch dieses therapeutische Vorgehen erzielbaren Veränderungen einzelner Parameter gegenüber den nur mit Bleomycin behandelten Tieren (n=9) sowie den nur mit NaCl 0,9% exponierten Kontrolltieren direkt gegenüber gestellt. Es wurden je 7 Tiere mit früher, beziehungsweise später, Heparinvernebelung und 5 beziehungsweise 7 Tiere mit früher, beziehungsweise später, Urokinasevernebelung untersucht.

Infolge der am 28. Tag post Bleomycin bereits wieder zu beobachtenden weitgehenden Normalisierung des Gasaustausches wurden auch keine signifikante Veränderungen der arteriellen pO₂ Werte (unter Raumluft) beobachtet. Zwar zeigten sich deutlich und signifikant erniedrigte Werte bei den nur mit Bleomycin (Bleo) behandelten Tiere (Abb. 7). In den Behandlungsgruppen war auch mit Ausnahme der frühen u-PA Verabreichung eine weitgehende Normalisierung der paO₂ Werte zu beobachten, dieses war aber nicht signifikant.

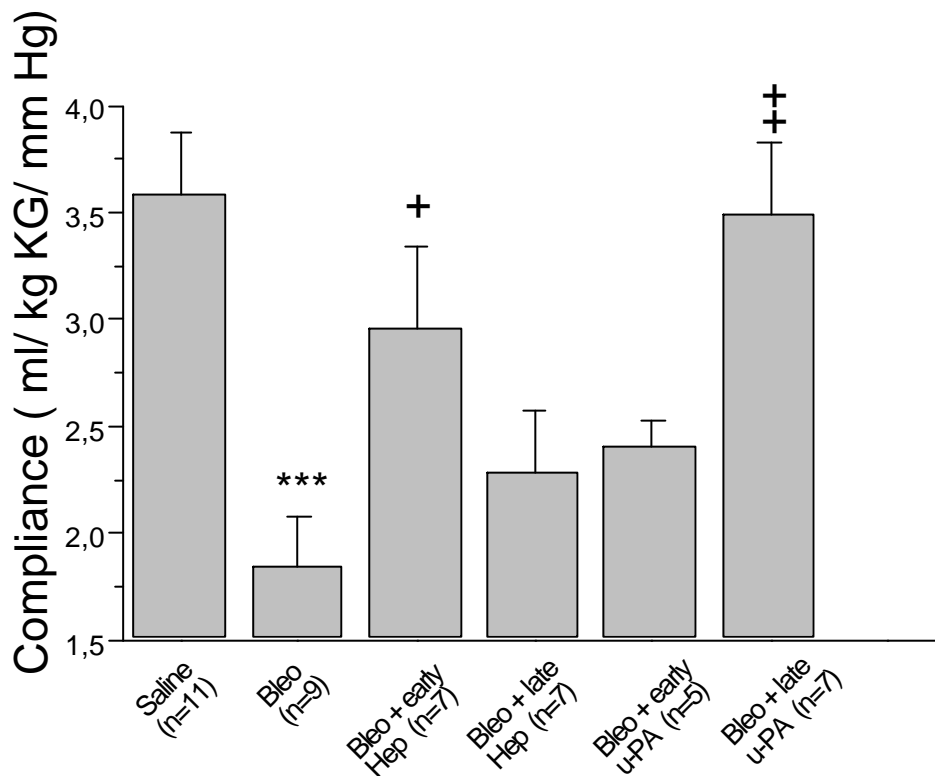
Abbildung 7

Gasaustauschwerte von mit Bleomycin behandelten Kaninchen nach inhalativer Behandlung mit Heparin oder Urokinase. Gezeigt werden die $MW \pm SE$ des arteriellen pO_2 gemessen unter maschinellen Beatmung mit Raumluft. Mit NaCl behandelte Kaninchen (Saline), Mit Bleomycin behandelte Kaninchen ohne inhalative (Bleo) und vier Therapiegruppen zum einen frühe Heparin Behandlung am 2, 4, 6, 8, 10 und 12 Tag nach Bleomycinapplikation (Bleo+early Hep) und späte Heparin Behandlung am Tag 14, 16, 18, 20, 22 und 24 (Bleo + late Hep) zum anderen frühe Urokinase Behandlung an den Tagen 2, 4, 6, 8, 10 und 12 nach Bleomycinapplikation (Bleo+early u-PA) und späte Urokinase Behandlung an den Tagen 14, 16, 18, 20, 22 und 24 nach Bleomycinapplikation (Bleo + late u-PA). Significancelevel ist gekennzeichnet durch ** ($p < 0.01$; Vergleich von Bleo zu Saline).

Deutlicher wurde die therapeutische Effizienz einer inhalativen u-PA- bzw. Heparinbehandlung bei der Analyse der Lungendehnbarkeit. Wie in Abbildung 8 ersichtlich, konnte durch alle therapeutischen Regime der Verlust der Lungendehnbarkeit beeinflusst werden. Im Falle der frühen Heparin – und späten Urokinaseverabreichung konnte eine signifikante Besserung der Compliancewerte im Vergleich zur nur mit Bleomycin exponierten Gruppe beobachtet werden, im Falle der späten Urokinasetherapie war die annähernd volle Normalisierung der Compliance evident (Abb. 8) .

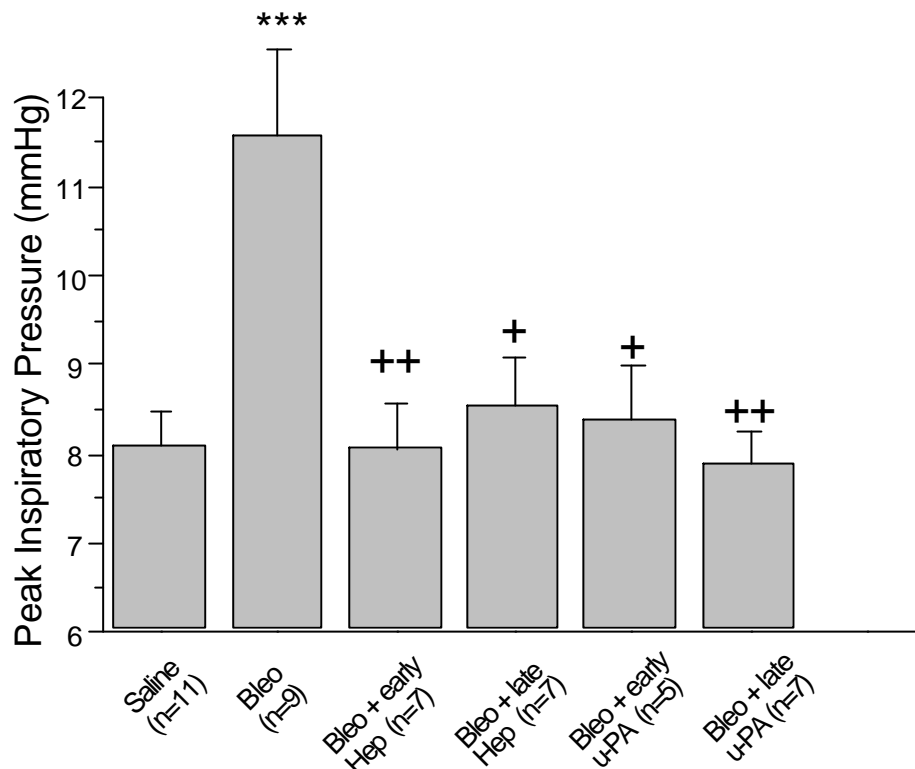
In Analogie hierzu konnte ebenfalls eine weitreichende Beeinflussung des Spitzendruckes unter maschineller Beatmung registriert werden. Dieses war für alle Behandlungsgruppen nachweisbar (Abb. 9).

Abbildung 8



Statische Lungencompliance von Bleomycin behandelten Kaninchen nach inhalativer Behandlung mit Heparin oder Urokinase. Gezeigt werden die MW \pm SE der statischen Compliancewerte gemessen in Situ an den mit NaCl behandelten Kaninchen (Saline), Mit Bleomycin behandelte Kaninchen ohne inhalative Therapien (Bleo) und vier Therapiegruppen zum einen frühe Heparin Behandlung am 2, 4, 6, 8, 10 und 12 Tag nach Bleomycinapplikation (Bleo+early Hep) und späte Heparin Behandlung am Tag 14, 16, 18, 20, 22 and 24 (Bleo + late Hep) zum anderen frühe Urokinase Behandlung an den Tagen 2, 4, 6, 8, 10 and 12 nach Bleomycinapplikation (Bleo+early u-PA) und späte Urokinase Behandlung an den Tagen 14, 16, 18, 20, 22 and 24 nach Bleomycinapplikation (Bleo + late u-PA). Significancelevel ist gekennzeichnet durch*** ($p < 0.001$; Vergleich von Bleo zu Saline) und durch + ($p < 0.05$) oder ++ ($p < 0.01$) im Vergleich der behandelten Gruppen zur nur mit Bleomycin behandelten Gruppe (Bleo).

Abbildung 9



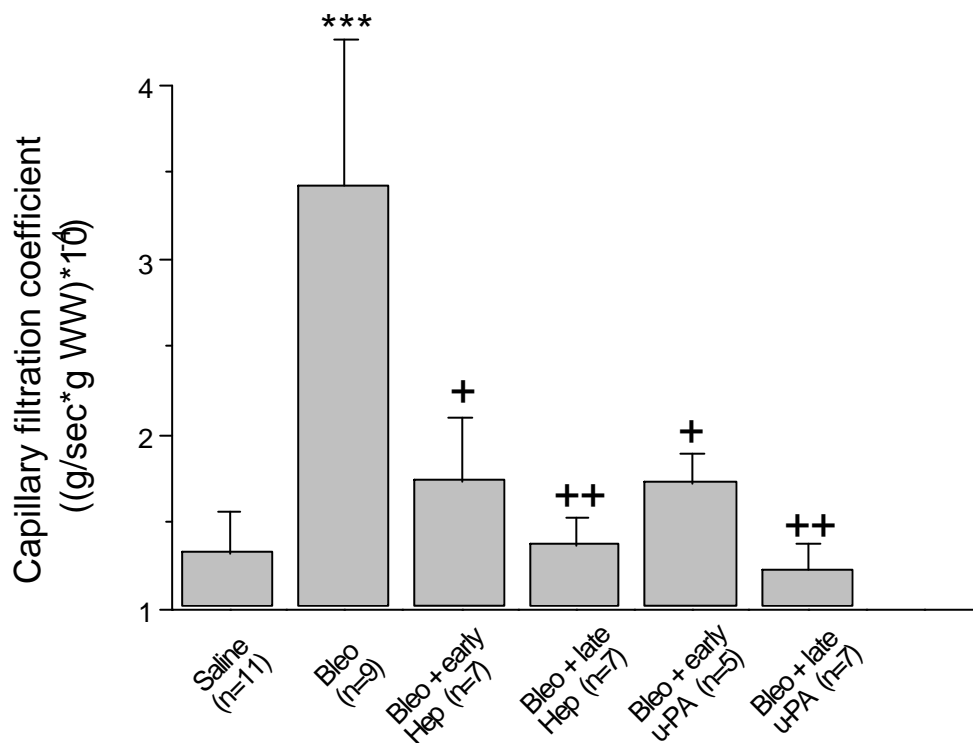
Beatmungsspitzenndruck von mit Bleomycin behandelten Kaninchen nach inhalativer Behandlung mit Heparin oder Urokinase. Gezeigt werden die MW \pm SE des Beatmungsspitzenndruckes gemessen an der isolierten, perfundierten und maschinell beatmeten Kaninchenlunge mit NaCl behandelte Kaninchen (Saline), Mit Bleomycin behandelte Kaninchen ohne inhalative (Bleo) und vier Therapiegruppen zum einen frühe Heparin Behandlung am 2, 4, 6, 8, 10 und 12 Tag nach Bleomycinapplikation (Bleo+early Hep) und späte Heparin Behandlung am Tag 14, 16, 18, 20, 22 and 24 (Bleo + late Hep) zum anderen frühe Urokinase Behandlung an den Tagen 2, 4, 6, 8, 10 and 12 nach Bleomycinapplikation (Bleo+early u-PA) und späte Urokinase Behandlung an den Tagen 14, 16, 18, 20, 22 and 24 nach Bleomycinapplikation (Bleo + late u-PA). Significancelevel ist gekennzeichnet durch *** ($p < 0.001$; verglichen Bleo mit Saline) und durch + ($p < 0.05$) oder ++ ($p < 0.01$) Im Vergleich von Therapiegruppen zu nur mit Bleomycin behandelten Kaninchen (Bleo).

Die hier untersuchten therapeutischen Interventionen bewirkten offenbar auch eine weitere Reduktion der normalerweise nach 28 Tagen im gewissen Umfang noch nachweisbaren Schrankenstörung. So konnte in allen Therapiegruppen eine komplette Normalisierung des kapillaren Filtrations Koeffizient K_{fc} (Abb. 10) beobachtet werden. Passend hierzu waren auch der Gesamtproteingehalt in den Bronchoalveolären Lavagen (BAL) in allen Therapiegruppen im Vergleich zur nur mit Bleomycin exponierten Gruppe deutlich und signifikant reduziert (Tabelle 4), eine komplette Normalisierung war allerdings diesbezüglich nicht festzustellen. Wenig Einfluss entfalteten die hier vorgenommenen therapeutischen

Interventionen auf das Differentialzellbild in der BAL, das allerdings 28 Tage post Bleomycin auch bereits ohne Therapien weitgehend normalisiert war (Tabelle 4).

Keine der therapeutischen Interventionen führte zu einer Änderung des Blutbildes des peripheren Blutes, entsprechend ergab sich auch kein Hinweis für eine Blutungsanämie (Tabelle 5).

Abbildung 10



Kapilläre Filtration Koeffizient (Kfc) von mit Bleomycin behandelten Kaninchen nach inhalativer Behandlung mit Heparin oder Urokinase. Gezeigt werden die MW \pm SE des Kapilläre Filtration gemessen an der isolierten, perfundierten und maschinell beatmeten Kaninchenlunge, mit NaCl behandelte Kaninchen (Saline), Mit Bleomycin behandelte Kaninchen ohne inhalative (Bleo) und vier Therapiegruppen zum einen frühe Heparin Behandlung am 2, 4, 6, 8, 10 and 12 Tag nach Bleomycinapplikation (Bleo+early Hep) und späte Heparin Behandlung am Tag 14, 16, 18, 20, 22 and 24 (Bleo + late Hep) zum anderen frühe Urokinase Behandlung an den Tagen 2, 4, 6, 8, 10 and 12 nach Bleomycinapplikation (Bleo+early u-PA) und späte Urokinase Behandlung an den Tagen 14, 16, 18, 20, 22 and 24 nach Bleomycinapplikation (Bleo + late u-PA). Significancelevel ist gekennzeichnet durch *** ($p < 0.001$; verglichen Bleo zu Saline) und durch + ($p < 0.05$) oder ++ ($p < 0.01$) Im Vergleich von Therapiegruppen zu nur mit Bleomycin behandelten Kaninchen (Bleo).

Tabelle 4:**Proteingehalt und Differentialzellbild in der BAL[§]**

	n	Protein [mg/ml]	Gesamtzellzahl [x10 ⁶]	Macrophagen [%]	Neutrophile [%]	Lymphocyten [%]
Saline	11	0.257±0.02	52.7±4.7	97±0.7	1.6±0.5	1.5±0.5
Bleo	9	1.304±0.24***	145.6±75.7**	92±2.4	6.2±1.9	1.7±0.5
Early Hep	7	0.733±0.14**	174±10.7	95±0.9	2.8±0.5	2.3±0.6
Late Hep	7	0.716±0.08**	122±27.2	95±1.8	3.4±1.4	1.7±0.2
Early u-PA	5	0.526±0.09***	146±52.0	95±1.4	3.5±0.9	1.5±0.6
Late u-PA	7	0.532±0.09***	119±33.9	94±1.8	5.4±0.6	2.0±0.3

[§] - Dargestellt sind die Gesamtzellzahl, der Prozentuale Anteil der Alveolarmakrophagen, Neutrophilen und Lymphocyten von den mit NaCl behandelten Kontrollgruppe (Control), den nur mit Bleomycin exponierten (Bleo) und den Bleomycin behandelten und therapierten Tiere. MW ± SE sind jeweils angegeben.

Im Blutbild gab es, wie schon in Tabelle 3 bei den Ergebnissen der Induktion einer inflammatorischen Lungenerkrankung und -fibrose, keine Auffälligkeiten (Tabelle 5).

Tabelle 5:**Leucozyten, Erythrozyten, Thrombozyten, Hämoglobin im Blut[§]**

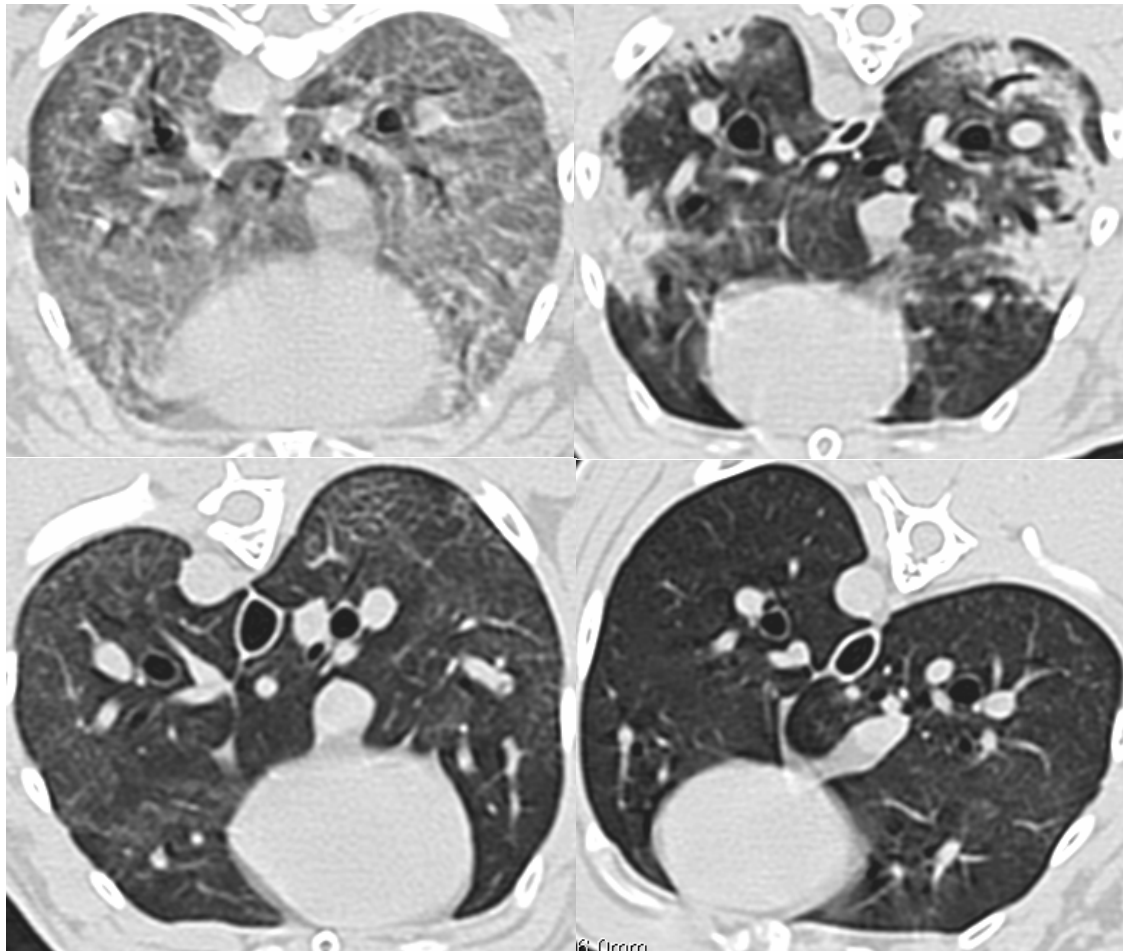
	n	Leucozyten [giga/l]	Erythrozyten [10 ⁶ /ml]	Thrombozyten [giga/l]	Hämoglobin [g/dl]	Hämatokrit [%]
Control	11	6.3±0.4	6.2±0.2	404±28	12.1±0.4	39±0.8
Bleo	9	6.9±0.8	6.3±0.2	402±22	12.2±0.4	40±1.0
Early Hep	7	5.7±0.4	5.9±0.2	398±27	12.5±0.3	39±1.0
Late Hep	7	6.3±0.6	6.0±0.1	410±36	12.3±0.4	38±0.9
Early u-PA	5	6.5±0.9	6.1±0.1	430±51	12.3±0.2	38±0.4
Late u-PA	7	6.4±0.6	6.2±0.2	363±35	12.6±0.5	39±1.4

[§] - Dargestellt sind die Leucozyten, Erythrozyten, Thrombozyten Zahl, der Hämatokrit und Hämoglobin Konzentration Lymphocyten von den mit NaCl behandelten Kontrollgruppe (Control), den nur mit Bleomycin exponierten (Bleo) und den Bleomycin behandelten und therapierten Tiere. MW ± SE sind jeweils angegeben.

In den HRCT Untersuchungen des Thorax konnte wie bereits oben beschrieben bei der Bleo-Gruppe ein fein retikuläres homogenes Muster, mit einer Betonung der basalen Lungenabschnitte, dokumentiert werden (siehe Abb. 11), während für die Kontrolltiere ein Normalbefund für alle intrathorakalen Organe festgestellt wurde. Bezüglich der Therapiegruppen zeigte sich auch bildgebend der Erfolg einer solchen therapeutischen Intervention. Vor allem die mit Heparin in der frühen Phase beziehungsweise Urokinase in der

späten Phase behandelten Tiere erwiesen einen deutlich besseren Befund im Vergleich zu der Bleomycin-Gruppe auf (Abb. 11).

Abbildung 11

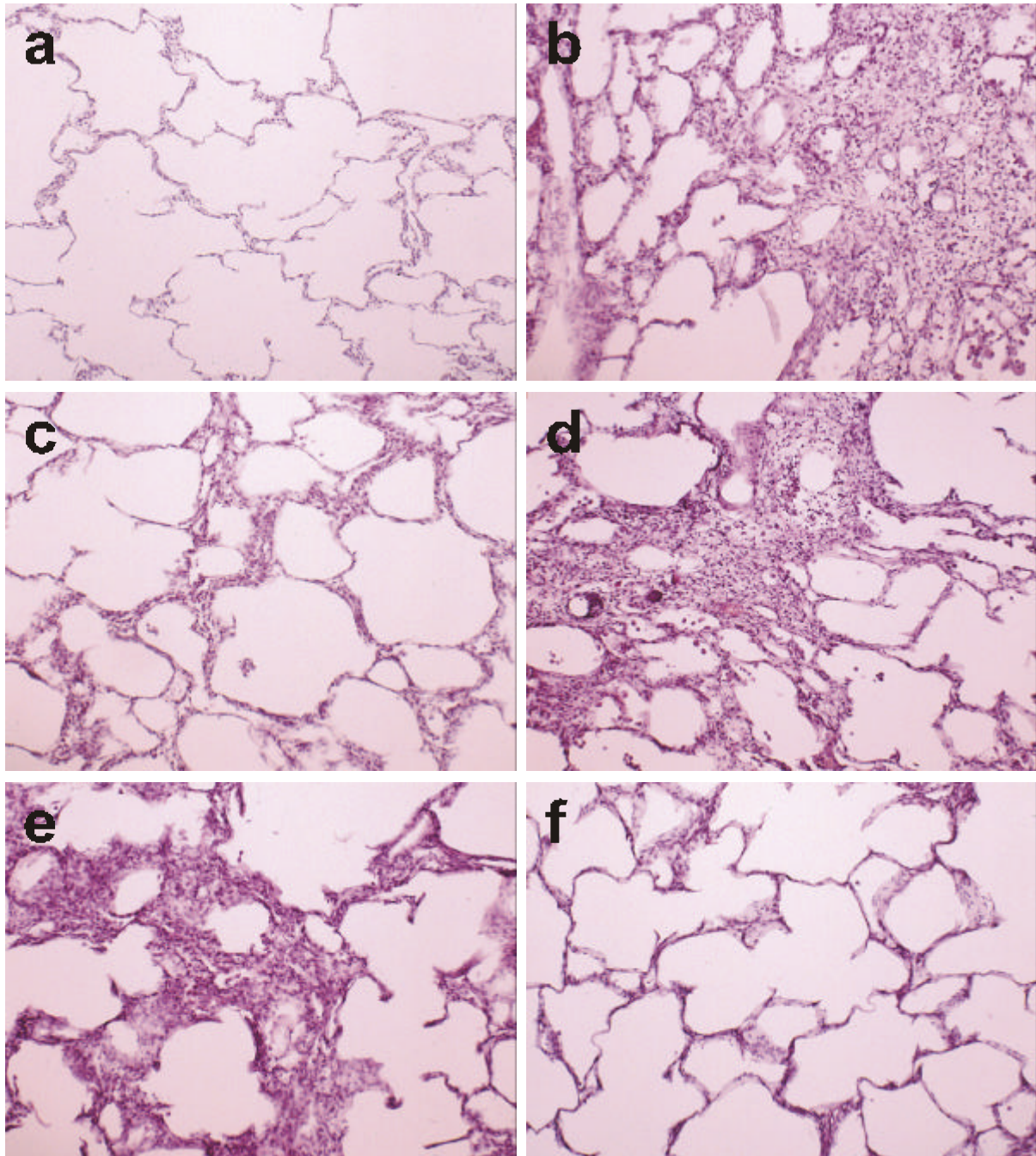


Scans von Bleomycin behandelten Kaninchen nach inhalativer Applikation of Heparin oder Urokinase. Gezeigt werden typische CT Scans von den basalen Lungenabschnitten eines nur mit NaCl behandelten Tieres (oben links), ein nur Bleomycin exponiertes Kaninchen (oben rechts), ein Bleomycin exponiertes Kaninchen behandelt mit Heparin an den Tagen 2, 4, 6, 8, 10 und 12 (unten links) und ein mit Bleomycin behandeltes Kaninchen therapiert mit Urokinase an den Tagen 14, 16, 18, 20, 22 und 24 (unten rechts).

Im Einklang hierzu war auch histologisch eine deutliche Reduktion fibrosierender Prozesse in den Therapiegruppen erkennbar. Bei keiner Therapieform wurde eine Leukozytäre Infiltration nachgewiesen. Gleichmaßen konnte bei der frühen Heparin- und der späten Urokinasebehandlung kaum noch eine Verbreiterung der Septen, eine vermehrte Anzahl von Fibroblasten und kaum vermehrt einsproßende Kapillaren nachgewiesen werden. Auch die

Bronchioalisierung terminaler Atemwege war in den Behandlungsgruppen deutlich reduziert, beziehungsweise nicht mehr nachweisbar (Abbildung 12).

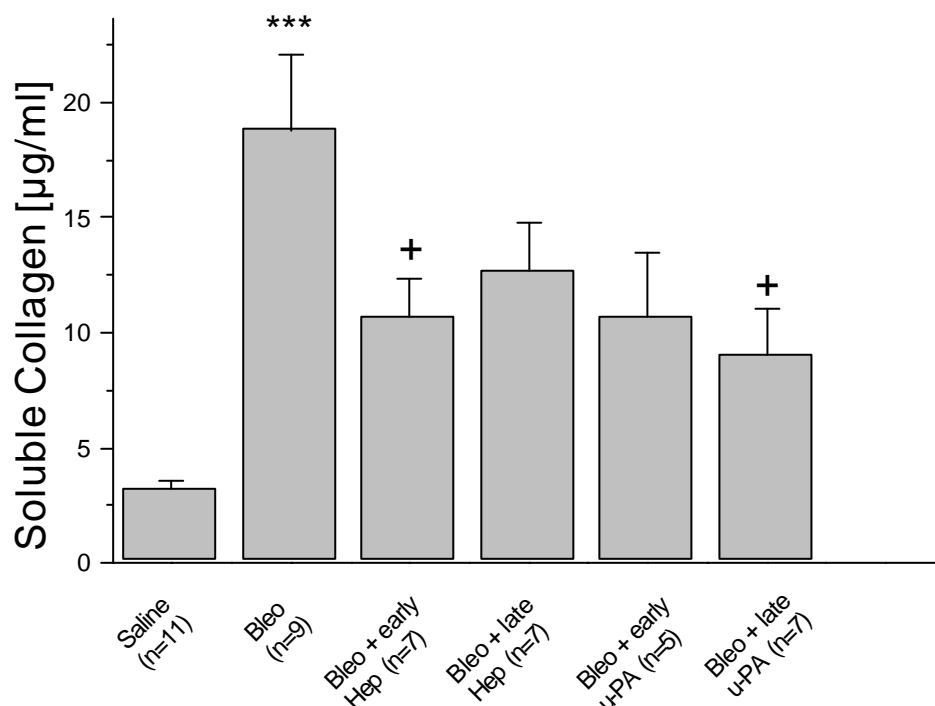
Abbildung 12



Histologische Veränderungen bei Bleomycin behandelten Lungen nach inhalativer Heparin - oder Urokinasetherapie. Lungengewebe wurde ein Formalin fixiert durch Perfusion der Pulmonalen Gefäße bei einem konstanten Druck bei 25cmH₂O in Endinspiration und Hämat oxylin-/Eosinfärbungen wurden angefertigt. a – Kontrolle (28 Tage nach inhalativer NaCl Applikation), b – Bleomycinbehandelte Lunge 28 Tage nach Behandlung, c – Bleomycinbehandelte Lunge mit früher Heparintherapie, d – Bleomycin behandelte Lunge , späte Heparintherapie, e – Bleomycin behandelte Lunge, frühe Urokinasetherapie, f – Bleomycin behandelte Lunge, späte Urokinasetherapie. a – f: 100x vergrößert.

Das lösliche Kollagen war am 28ten Tag bei den nur mit Bleomycin behandelten Tieren sechs mal so hoch, mit ca. 18µg/ml, als bei der Kochsalzgruppe mit etwa 3µg/ml. Dieser Unterschied war hoch signifikant. Im Vergleich dazu waren die Therapiegruppen nur drei bis viermal so hoch. In voller Übereinstimmung mit den Daten zur Compliance, den radiologischen und den histologischen Befunden konnte bei allen Behandlungsgruppen ein signifikanter Abfall des löslichen Kollagens in der BAL im Vergleich zur mit Bleomycin exponierten Gruppe festgestellt werden. Auch hier konnte bei den früh mit Heparin therapierten und spät mit Urokinase behandelten Tieren der größte Effekt festgestellt werden (Abbildung 13).

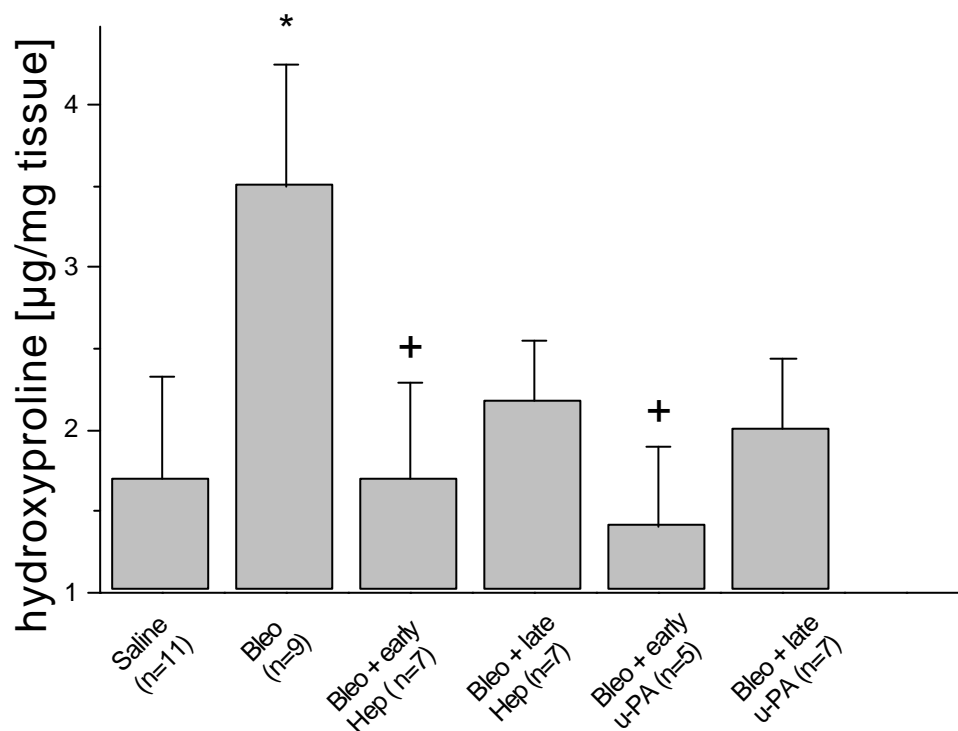
Abbildung 13



Lösliche Kollagenkonzentration in BAL von Bleomycin behandelten Kaninchen nach inhalativer therapeutischer Applikation von Heparin oder Urokinase. Gezeigt wird $MW \pm SE$ die lösliche Kollagenkonzentration bestimmt in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von NaCl exponierten Hasen (Saline), Bleomycin exponierten Kaninchen ohne inhalative Therapien (Bleo) und von vier Therapiegruppen entweder frühes Therapieschema mit Heparin an den Tagen 2, 4, 6, 8, 10 und 12 (Bleo+early Hep) und spätes an den Tagen 14, 16, 18, 20, 22 und 24 (Bleo + late Hep) oder frühe Urokinasebehandlung an den Tagen 2, 4, 6, 8, 10 und 12 (Bleo+early u-PA) und spätes an den Tagen 14, 16, 18, 20, 22 und 24 (Bleo + late u-PA). Significancelevel ist gekennzeichnet durch *** ($p < 0.001$; Vergleich von Bleo mit Saline) und mit + ($p < 0.05$) im Vergleich von den einzelnen Behandlungsgruppen mit nur Bleomycin (Bleo).

Der Hydroxyprolinegehalt der nur mit Bleomycin behandelten Tiere war mit $3,5\mu\text{g}/\text{mg}$ Gewebe, signifikant erhöht und etwa doppelt so hoch im Vergleich zur Kochsalz-behandelten Kontrollgruppe (ca. $1,7\mu\text{g}/\text{mg}$ Gewebe). Bei den Therapie Gruppen lagen die Werte deutlich niedriger, mit maximalen Werten um $2,2\mu\text{g}/\text{mg}$ Gewebe. Auch diesbezüglich konnte bei allen Therapieregimen eine deutliche Reduktion der Kollagendeposition erzielt werden (Abb. 14).

Abbildung 14



Hydroxyprolinanteil im getrockneten Lungengewebe von Bleomycin behandelten Kaninchen nach inhalativer therapeutischer Applikation von Heparin oder Urokinase. Gezeigt wird $\text{MW} \pm \text{SE}$ des Hydroxyprolinanteil im getrockneten Lungengewebe von NaCl exponierten Hasen (Saline), Bleomycin exponierten Kaninchen ohne inhalative Therapien (Bleo) und von vier Therapiegruppen entweder frühes Therapieschema mit Heparin an den Tagen 2, 4, 6, 8, 10 und 12 (Bleo+early Hep) und spätes an den Tagen 14, 16, 18, 20, 22 und 24 (Bleo + late Hep) oder frühe Urokinasebehandlung an den Tagen 2, 4, 6, 8, 10 und 12 (Bleo+early u-PA) und spätes an den Tagen 14, 16, 18, 20, 22 und 24 (Bleo + late u-PA). Significancelevel ist gekennzeichnet durch* ($p < 0.05$; Vergleich von Bleo mit Saline) und mit + ($p < 0.05$) im Vergleich von den einzelnen Behandlungsgruppen mit nur Bleomycin (Bleo).

7) Diskussion

7.1) Methodische Aspekte des hier zur Anwendung gekommenen Modells der Bleomycin induzierten Pneumonitis mit konsekutiver Fibrose

Bleomycin (BLM) ist ein Zytostatikum, welches vornehmlich bei Hodkin-/Non-Hodkin-Lymphomen und Hodentumoren eingesetzt wird. Bleomycin nimmt Einfluss auf verschiedene Phasen des Teilungszyklus, wird überwiegend renal ausgeschieden und hat eine Halbwertszeit von ca. 3 Stunden [LAZO (1994)]. Eine der Hauptnebenwirkungen ist die akute Pneumonitis, gefolgt von einer Fibrosierung des Organs. Die Lunge ist deswegen besonders gefährdet, da sie das Bleomycin inaktivierende Enzym Bleomycin-Hydrolase in deutlich geringerem Umfang exprimiert. Diese Nebenwirkung von Bleomycin wird experimentell zur Auslösung eines acute respiratory distress syndrome (ARDS) mit anschließender Entwicklung einer Lungenfibrose ausgenutzt. Hierfür wurde Bleomycin bislang in Tiermodellen mit Ratten [WILD (1994)], Mäusen, Hamstern [IYER (1995)], Hasen [TIMOTHY (1985); JONES (1998)] und Affen angewendet. Dabei wurde das Bleomycin entweder intratracheal instilliert [WILD (1994); IYER (1995); TIMOTHY (1985)], intravenös [PIGUET (1994)] oder intrapleural/-peritoneal [MATUSE (1995)] injiziert.

Das hier gewählte Vorgehen einer inhalativen Applikation von 1.8 U/kg b.w. Bleomycin beim gesunden Kaninchen ruft eine zunächst akute Entzündung des Lungenparenchyms hervor, welche einem ARDS entspricht. Ab dem vierten Tag war ein massiv beeinträchtigter Gasaustausch zu beobachten. In dieser frühen Phase fand sich entsprechend eine Transmigration von Leukozyten in das alveoläre Kompartiment, ein vielfacher Anstieg der endothelialen Gefäßpermeabilität und ein Übertritt von Plasmaproteinen in den alveolären

Raum. Hierzu passend konnte ein deutlicher Anstieg der prokoagulatorischen Aktivität in der bronchoalveolären Lavage (BAL) festgestellt werden. Histologisch zeigte sich in der frühen ARDS-ähnlichen Phase ein alveoläres Ödem, wie auch hyaline Membranen und Dystelektasen/Atelektasen. Zeitgleich stellten sich im HRCT des Thorax deutliche Verschattungen im Sinne von alveolären Konsolidierungen dar.

Trotz dieser schweren intrapulmonalen Veränderungen, welche durch die inhalative Bleomycinapplikation hervorgerufen wurden, konnten keine Veränderungen im Differential-Blutbild des peripheren Blutes beobachtet werden.

Einige hier in der ARDS-typischen Frühphase beobachteten Veränderungen wurden bereits bei anderen Spezies (Ratte, Maus) nach Installation von Bleomycin in die Trachea beschrieben. Diese beinhalten sowohl das Plasmaprotein leakage [THRALL (1987)], die Aktivierung der extrinsischen Gerinnungskaskade im alveolären Kompartiment [IDELL (1987c); OLMAN (1995)], die Rekrutierung eosinophiler und neutrophiler Granulozyten [THRALL (1979); HASLETT (1989)], die Zunahme der endothelialen Permeabilität [THRALL (1979); WANGENSTEEN (1983)] und die Aktivierung von Zytokinen [PIGUET (1997); ZHANG (1997)].

Bislang existierten keine Daten zum zeitlichen Verlauf der Gasaustauschstörung nach der Bleomycinapplikation beim Kaninchen. Dieses beruht wohl auf den Einschränkungen bei der Durchführbarkeit von Blutgasanalysen bei den kleineren Tierspezies.

Im Anschluß an die ARDS-ähnliche Frühphase entwickelte sich die spätere fibroproliferative Phase. Kennzeichnet hierfür fand sich ein erheblicher Abfall der quasi-statischen Compliance und ein Anstieg des inspiratorischen Spitzendruckes unter Volumen-gesteuerter Beatmung. Parallel konnte eine Zunahme des löslichen Kollagens in der BAL wie auch ein Anstieg des Hydroxyprolins im Gewebe beobachtet werden. Dieses wurde auch schon bei Ratten beschrieben [HORIUCHI (1990)], und legt die vermehrte Synthese und Akkumulation von Typ I [SHAHZEIDI (1994)] und Typ IV [SPECKS (1995)] Kollagen an. Ursächlich könnte

dieser vermehrten Kollagendeposition die vermehrte und bereits beschriebene Aktivierung von transforming growth factor $\beta 1$ [COKER (1997)], epithelial growth factor [TEMELKOVSKI (1997)] und platelet derived growth factor-A und -B [GURUJEYALAKSHMI (1999)] zu Grunde liegen.

Über den bisherigen Kenntnisstand hinaus weist das hier vorgestellte Modell allerdings Vorteile und neuen Erkenntnisse auf:

Erstens ergeben die bislang am Kaninchen durchgeführten Versuche der Induktion einer Lungenfibrose mit ähnlichen Dosen wie sie bei der Maus oder der Ratte benutzt werden (10U/kg b.w.) [TIMOTHY (1985)], eine nur begrenzte fibrotische Reaktion [HORIUCHI (1990); BEREND (1985)]. Für diese scheinbare „Bleomycin-Resistenz“ wurden ein möglicherweise hoher Expressionsgrad der Bleomycin-Hydrolase verantwortlich gemacht. Deshalb wurden Kaninchen bisher selten für Studien der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose eingesetzt. In der hier vorgelegten Untersuchung konnte, im Gegensatz zu den vorherigen Untersuchungen, eine eindeutige, ausreichende und reproduzierbare fibrosierende Antwort der Kaninchenlunge auf nur 1.8U/kg K.G. Bleomycin gezeigt werden.

Zweitens waren bislang nur drei verschiedene Wege der Bleomycinapplikation etabliert und zwar die intravenöse Injektion, die intraperitoneale Deposition und die intratracheale Instillation. Alle drei Ansätze sind mit Nachteilen behaftet. Die intravenöse und intraperitoneale Gabe geht mit mannigfaltigen systemischen Reaktionen und Nebenwirkungen einschließlich der Myelosuppression einher. Die intratracheale Deposition bewirkt in der Regel eine peribonchial/peribronchiolär betonte inflammatorische Reaktion mit nachfolgender Fibrose [THRALL (1979)]. Diese inhomogene Verteilung der fibrotischen Antwort ist wahrscheinlich auch von anatomischen Dimensionen abhängig und entsprechend am großen Tier mit einem entsprechend höheren Totraumvolumen noch ausgeprägter. In dieser Studie wurde die Zielsetzung, das Bleomycin relativ gleichmäßig im alveolären Kompartiment zu verteilen, durch die inhalative Applikation erreicht. Es fand sich dabei ein weitgehend

homogenes Auftreten der inflammatorischen, später der fibrotischen Veränderungen und somit ein der klinischen Realität eher entsprechendes Verteilungsmuster. Darüber hinaus traten keinerlei systemische Nebenwirkungen oder Komplikationen auf.

Zusammenfassend erscheint das hier beschriebene Modell in besonderem Umfang geeignet die bei der Entwicklung des ARDS mit anschließender Fibrose zugrunde liegenden Mechanismen zu studieren und therapeutische Optionen zu überprüfen.

Eine wichtige Voraussetzung für eine gute Reproduzierbarkeit der durch die Bleomycin-Applikation hervorgerufenen inflammatorischen und fibrotischen Veränderungen ist die strikte Kontrolle des Verhältnisses zwischen dem Körpergewicht des Tieres und der Menge des vernebelten Bleomycins. Um dieses zu sichern, wurde in Vorversuchen der dabei verwendete Ultraschallvernebler (Portasonik I®) mit ⁹⁹Technetium getestet und dadurch die pulmonale Depositionrate ermittelt. Diese Vorversuche fanden unter den für die Versuche festgelegten Konditionen mit dem Volumenkontrolliertem Beatmungsmodus (30*30 ml/min, PEEP 1cm H₂O) im Abzug statt.

Bei diesen Vorversuchen zeigte sich, dass die pulmonale Deposition von 2.4 U/kg K.G. Bleomycin eine zu hohe Dosis darstellt. Hierbei verstarben alle Tiere (n=4) innerhalb der ersten 4 Tage nach der Vernebelung. Im Gegensatz dazu konnte nach inhalativer Applikation von 1.2 U/kg K.G. Bleomycin kaum eine Schädigung der Lungen beobachtet werden (Daten nicht im Detail aufgeführt).

Nach diesen Vorversuchen wurde dann die Dosis von 1.8 U/kg b.w. Bleomycin gefunden beziehungsweise festgelegt, mit welcher dann die hier aufgeführten Ergebnisse in gut reproduzierbarem Umfang erzielt werden konnten.

Schließlich wurde in den meisten bisher erhobenen Untersuchungen am Modell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose der Ausprägungsgrad der Fibrose mit der Zunahme des Hydroxiprolingehaltes des Lungenparenchym gleichgestellt. In der hier vorgestellten Studie stimmen die für die Fibroselungen post Bleomycin ermittelten Werte mit der in der Literatur

angeführten, fast zweifachen, Zunahme überein. Deutlich auffälliger war jedoch die ca. dreißigfache Zunahme des löslichen Kollagens in der BAL als Antwort auf die Bleomycinbehandlung. Die Kinetik dieser Variablen ging mit der parallelen Abnahme der Compliance einher. Die Bestimmung des löslichen Kollagens in der bronchoalveolären Lavage könnte sich nach den hier erhobenen Werten als ein hilfreiches Werkzeug zur Bestimmung des Kollagenumsatzes auch beim Patienten darstellen, wie auch schon von Malkusch et al 1995 vorgeschlagen [MALKUSCH (1995)].

7.2) Therapie der Lungenfibrose mit inhalativ verabreichtem Heparin- oder Urokinase.

Wesentlicher Teil dieser Studie war es, durch repetitive inhalative Heparin- oder Urokinaseapplikation die alveoläre hämostaseologische Balance zu korrigieren und somit das Ausmaß der sich entwickelnden Fibrose zu attenuieren. Zur besseren Beurteilbarkeit des optimalen Therapiezeitraums wurden beide Agenzien jeweils während der frühen ARDS-typischen, wie auch der späten Fibrose-typischen Phase durchgeführt. Die pulmonal deponierte Dosis von Heparin betrug im Schnitt 3500 i.E. pro Vernebelung. In Vorversuchen wurde gezeigt, dass mit dieser Dosis eine systemische antikoagulatorische Wirkung nicht erreicht wird (an Hand der PTT-Werte im Blut, Daten nicht im Detail gezeigt). Jedoch wurde in den bronchoalveolären Lavagen eine signifikante und anhaltende Verlängerung der Rekalzifizierungszeit erreicht. So war der antikoagulatorische Effekt im alveolären Kompartiment noch 36 Stunden nach der Vernebelung nachweisbar und belegt somit die grundsätzlich unterschiedliche Pharmakokinetik des Heparins nach inhalativer Aufnahme [KOHLER (1990)].

Bei den Urokinase Applikationen wurden ca. 6500 i.E. pro Inhalation pulmonal deponiert. Pilotstudien an der isolierten, perfundierten und ventilierten Lunge zeigten, dass die alveoläre Deposition dieser Dosis an Urokinase nicht zu einer erhöhten endothelialen und epithelialen Permeabilität führt, wohl aber zu einer deutlich gesteigerten fibrinolytischen Aktivität in der Lavage (BAL). Bei gesunden Tieren wurde nach der alveolären Deposition dieser u-PA Dosis kein Übertritt in die Zirkulation beobachtet (Nachweis per ELISA, Daten nicht im Detail gezeigt).

In Übereinstimmung mit diesen Pilotstudien wurde in den hier beschriebenen Versuchen bei gesunden Kontrollen wie auch bei den mit Bleomycin vorbehandelten Tieren keinerlei systemische Nebenwirkung (im Sinne eines gehäuftten Auftretens extrapulmonalen

Blutungen) nach inhalativer Behandlung mit Heparin oder Urokinase beobachtet. Ebenso konnte auch der histologischen Untersuchungen der Lungen kein Anhalt für Einblutungen im Alveolarbereich erhoben werden, so dass die wiederholte inhalative Behandlung mit Heparin oder Urokinase, in dem in dieser Studie verwendeten Dosisbereich, zumindest als ein Nebenwirkungsarmer Therapieansatz angesehen werden kann.

Demgegenüber steht die deutliche Effizienz beider Agentien. So zeigten alle Variablen, welche die Entwicklung einer Lungenfibrose widerspiegeln, sowohl unter der Therapie mit Heparin, als auch unter der mit Urokinase eine deutliche Veränderung im Sinne einer umfassenden Reduktion des Fibrosegrades.

Eine bemerkenswerte Beobachtung stellt dieser erkennbare Therapieerfolg einer frühen Heparin- beziehungsweise einer späten Urokinasetherapie bei der mit Bleomycin behandelten Tieren dar. In diesen Gruppen wurde eine vollkommene Normalisierung in Hinblick auf die statische Compliance und den inspiratorischen Spitzendruck (im volumenkontrollierten Beatnungsmodus 30*30ml/min) erzielt, bei weiterhin annähernd normalisierten Befunden hinsichtlich Kollagensynthese, Histologie und HRCT-Befund.

Diese Beobachtungen stimmen folglich mit dem Konzept überein, daß die im Gefolge inflammatorische Lungenprozesse auftretende alveoläre Fibrinbildung ein wichtiger Triggermechanismus der Entwicklung nachgeschalteter Fibosierungsprozesse sein könnten. Es ist anhand der vorgelegten Studie allerdings nicht eindeutig abzuleiten, ob die therapeutische Effizienz von Heparin oder Urokinase ausschließlich über die Modulation der Fibrindeposition (Heparin: Prävention; uPA: Auflösung) erklärt werden kann. So blockiert Heparin auch das proproliferativ und mitogen wirkende Thrombin [OHBA (1994); HERMANDES-RODRIGUES (1995); GRAY (1995)], und weist darüber hinaus ein pleiotropes Profil zellulärer Wirkungen im Sinne einer Reduktion der Proliferationsrate auf. Hierzu passend wurden in der Vergangenheit für unfractioniertes Heparin eine Reihe Hämostaseunabhängiger, zellulärer Effekte beschrieben, die alternative Erklärungen für eine

therapeutische Wirksamkeit bei fibrosierenden Lungenerkrankungen bieten könnten. Zu diesen zählen die IP3-Rezeptor-Blockade und die Suppression der Inositolphosphat-abhängigen intrazellulären Calciumfreisetzung [GHOSH (1988)], die Inhibition der Transmigration von T-Lymphozyten [LIDER (1990)] und Granulozyten [MATZNER (1984)], die Hemmung der Proliferation von Fibroblasten, Epithelzellen oder glatten Muskelzellen [SAKAKI (2000); GARG (2000); HARDINGHAM (1992)], die Modulation der biologischen Wirkung saurer oder basischer FGFs [ISHIHARA (1994)] und die Suppression der Produktion von proinflammatorischen und promitogenen Eicosanoiden wie LTC₄-E₄ sowie TxB₂ [SUZUKI (2000)]. Für u-PA ist neben der Aktivierung des Plasminogens auch die Aktivierung von Matrix-Metallo-Proteasen beschrieben. Unbeschadet von diesen Überlegungen ist natürlich der Befund einer besonderen Wirksamkeit von Therapien in der Phase der maximalen alveolären Gerinnungsaktivierung (das Maximum lag in der Zeit vom vierten bis sechzehnten Tag [INDEL (1987); OHLMAN (1995); OLMAN (1996)]), wie auch von u-PA in der Phase der weitgehend abgeschlossenen Fibrinbildung sehr gut mit der Vorstellung in Einklang zu bringen, dass vor allem die dauerhafte Alveolarwandapposition durch Fibrin ein Schlüsselmechanismus der Fibroblasteneinsprossung und der Aktivierung darstellt.

Die hier vorgelegten Ergebnisse fügen sich nahtlos in eine Reihe zeitgleich durchgeführter Studien ein, die den Stellenwert der alveolären hämostaseologischen Balance für die Induktion fibroproliverativer Prozesse belegen:

So zeigte sich bei PAI-1 überproduzierenden Mäusen eine Verstärkung, bei PAI-1 knock-out-Mäusen eine Attenuierung der Fibroseentwicklung durch Bleomycin [EITZMAN (1996)]. Als wirkungsvoll zur Verminderung der Bleomycin induzierten Lungenfibrose haben sich auch systemisch verabreichtes Heparin [HOWELL (2001); PIGUET (1996)], die systemische Applikation von direkten Thrombinhemmstoffen oder die tracheale Applikation von aktiviertem Protein C [YASUI (2001)] erwiesen.

7.3) Ausblick

Das Bleomycin-Modell der Lungenfibrose ist sicherlich repräsentativ für alle inflammatorisch getriggerten Formen der Lungenfibrose (Exogen allergische Alveolitis, Sarkoidose, post ARDS-Fibrose). Es ist allerdings gegenwärtig unklar, ob Ergebnisse, die am Bleomycin-Modell der Lungenfibrose erhalten wurden, auch auf die Gruppe der sogenannten Idiopathischen Interstitiellen Pneumonien (allen voran die Idiopathische Pulmonale Fibrose) übertragen werden kann.

In der hier vorgelegten Studie wurden auf tierexperimenteller Ebene neue Therapieansätze zur Behandlung der Fibrose als wirksam identifiziert. Die hier gewonnenen Erkenntnisse lassen auf eine Wirksamkeit unter klinischen Bedingungen schließen. Vor dem Hintergrund der für die Gruppe der Idiopathischen Interstitiellen Pneumonien ebenfalls nachgewiesenen weitreichenden Veränderung des alveolären Gerinnungssystems kann eine Wirksamkeit der hier präklinisch überprüften Therapieansätze (Urokinase, Heparin) auch für dieses Patientenkollektiv vermutet werden

Klinische Studien zur Sicherheit und Effizienz einer inhalativen Therapie mit Urokinase oder Heparin bei Patienten mit fibrotisierenden Lungenerkrankungen erscheinen also angeraten und sind vor kurzer Zeit auch initiiert worden.

8.1) Zusammenfassung

Fibrosierende Lungenerkrankungen stellen aufgrund ihrer Häufigkeit und ihres oft therapierefraktären und progredienten Verlaufs ein besonderes Patientengut in der Pneumologie dar. Gerade im Fall der Idiopathischen Interstitiellen Pneumonien besteht derzeit weitgehende Unkenntnis der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen. Seit kurzem ist bekannt, dass auch bei fibrosierenden Lungenerkrankungen weitreichende Änderungen des alveolären Gerinnungssystems, mit Hochregulation prothrombotischer und Suppression fibrinolytischer Prozesse, auftreten. Über die intermediäre Bildung profibrotisch wirkender Gerinnungsprodukte (z.B. Thrombin), über die Wechselwirkung mit pulmonalem Surfactant, über die „Verklebung“ atelektatischer Lungenbezirke und über die Suppression fibrinolytischer Faktoren könnten diese Veränderungen zur Entwicklung einer Fibrose beitragen.

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss einer repetitiven inhalativen Verabreichung von Urokinase oder Heparin an einem tierexperimentellen Modell der Lungenfibrose untersucht. Hierzu wurde Kaninchen unter Narkose und mechanischer Beatmung 1,8U/kg KG Bleomycin als Aerosol verabreicht. In der Folge entwickelte sich zunächst ein ARDS-typisches Geschehen, gefolgt von einer ausgeprägten Lungenfibrose. An diesem Modell wurde entweder in einer frühen (Tag 2, 4, 6, 8, 10, 12) oder einer späten Phase (Tag 14, 16, 18, 20, 22, 24) jeweils ~6000 U Urokinase oder ~3500 U Heparin repetitiv inhalativ unter Spontanatmung pulmonal deponiert

Durch die Verabreichung von Heparin und Urokinase (wobei die frühe Heparinbehandlung und die späte Urokinasetherapie am effektivsten waren) wurde ein fast komplette Unterdrückung der fibroproliferativen Antwort erreicht. Dieses beinhaltet eine weitgehende Normalisierung der statischen Compliance, eine weitgehende Reduktion des löslichen Kollagens in der bronchoalveolären Lavage und des Hydroxyprolinanteils im Trockengewicht

der Lungen. Diese Ergebnisse konnten auch durch die Bildgebung mittels HRCT und Histologie untermauert werden.

Diese Untersuchungen stützen die Annahme, dass die Bildung von intraalveolärem Fibrin einen wichtigen Stellenwert bei der Entwicklung der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose darstellt. Es kann gefolgert werden, dass die kompartmentalisierte Korrektur der alveolären Gerinnungsbalance durch inhalative Verabreichung antikoagulativer oder fibrinolytischer Agentien einen möglichen Therapieansatz zur Behandlung der Lungenfibrose darstellt.

8.2) Summary

Fibrotic lung diseases represent an important field in pneumology, mainly due to their frequency and often encountered therapeutic resistance and the progressive course of the disease. Especially concerning the idiopathic interstitial pneumonias there is a lack of knowledge regarding the underlying molecular mechanisms. It has recently been shown that fibrotic lung diseases are accompanied by marked changes in intraalveolar coagulation, with up-regulation of prothrombotic and suppression of fibrinolytic activities. Through the intermediate formation of profibrotic factors (such as thrombin), the interaction with pulmonary surfactant, the cohesion of atelectatic lung areas and the suppression of fibrinolytic factors, these changes could contribute to the development of fibrosis.

The present study examined the influence of a repetitive inhalative administration of urokinase or heparin in a rabbit model of lung fibrosis. This was achieved by sedation and mechanical ventilation with 1.8U/kg bodyweight bleomycin as an aerosol. In consequence, an ARDS-typical situation developed, followed by a marked lung fibrosis. Either during an early (day 2,4,6,8,10,12) or the later phase (day 14,16,18,20,22,24) the rabbits were then repetitively treated with either ~6000U urokinase or ~3500U heparin per aerosol via spontaneous breathing.

The administration of both, heparin and urokinase lead to a nearly complete suppression of the fibroproliferative answer, with the early heparin and the late urokinase treatment being most effective. This included an almost complete normalisation of static compliance, a marked reduction of both the soluble collagen in the bronchoalveolar lavage and the hydroxyproline content lungtissue. The results were confirmed by HRCT-imaging and histology.

The present study supports the hypothesis that the formation of intraalveolar fibrin plays an important role in the development of bleomycin induced lung fibrosis. In conclusion, the

compartimentalised correction of the alveolar coagulation balance by inhalative administration of anticoagulative or fibrinolytic agents offers as possible therapeutic option in the treatment of lung fibrosis.

9) Literaturverzeichnis

- ASHBAUGH, D. G., D. B. Bigelow, T. L. Petty und B. E. Levine.** Acute Respiratory Distress in Adults. *Lancet* II: 319-323; **1967**
- BACHHOFEN, M. und E. F. Weibel.** Struktural alteration of lung parenchyma in the adult respiratory distress syndrome. *Clinical chest medicine* 3: 35-56; **1982**
- BALIS, J. U., S. A. Shelley, M. J. MacCue und E. S. Rappaport.** Mechanismns of damage of the lung surfactant system. Ultrastructure and quantifikation of normal and in vitro inactivated lung surfactant. *Experimental and molecular pathologie* 14: 243-264; **1971**
- Berg R.** Determination of 3- and 4-hydroxyproline. *Meth Enzymol* 82: 372; **1982**
- BEREND, N, D. Feldien, D. Cederbaums, R. M. Cherniack.** Structure-function correlation of early stages of lung injury induced by intratracheal bleomycin in the rabbit. *Am. Rev. Respir. Dis.* 132:582-9. **1985**
- BERG, R. A.** Determination of 3- and 4-hydroxyproline. *Methods in Enzymology* 82: 372-398; **1982**
- BERNARD, G. R., A. Artigas, K. L. Bringham, J. Karlet, K. Falke, L. Hudson, M. Lamy, J. R. Legall, A. Morris, R. Spragg, und the consensus comitte** The European American Consensus Committe on ARDS *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 149: 818-824; **1994**
- BERTOZZI, P, B. Astedt, L. Zensius, K. Lynch, F. Le maire, W. Zapol und H. Chapman.** Depressed bronchoalveolar urokinase activity in patients with adult respiratory distress syndrome. *New england journal of medicine* 322: 890-897; **1982**
- BREDENBURG, C. E., A. M. Paskanik und G. F. Niemann.** High surface tension pulmonary edema. *Journal of surgical research* 34: 513-523; **1983**
- BURKHARDT, A.** Alveolitis and collaps in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *American rewiew of respiratory deseases* 140: 513-524; **1989**
- CHAPMAN, H. A., C. L. Allen und L. Stone.** Abnormelties in pathways in alveolar fibrin turnover among patients with interstitiell lung diseases. . *American rewiew of respiratory deseases* 134: 437-443; **1986a**
- CHAPMAN, H. A., J. J. Reilly und L. Kobzik.** Role of plasminogen aktivitator in degradation of extracellular matrix protein buy live human alveolar marcrophages. . *American rewiew of respiratory deseases* 133: 437-443; **1986b**
- COCKSHUTT, A. M., J. Weitz und F. Possmeyer.** Pulmonary sufactant-associated Protein A enhances the suerface activity of lipid extract surfactant and reverses inhibition by blood proteins in vitro. *Biochimistry* 29: 8424-8429; **1990**
- COKER, R. K., G. J. Laurent, S. Shahzeidi, P.A. Lympany, R. M. du Bois, P. K. Jefferey, R. J. McNulty.** Transforming growth factors-beta 1, -beta 2, and -beta 3 stimulate fibroblast procollagen production in vitro but are differentially expressed during bleomycin induced lung fibrosis. *Am. J. Pathol.* 150:981-991. **1997**
- COULTAS DB, Zumwalt RE, Black WC, Sobonya RE.** The epidemiology of interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 150:967-72; **1994**
- EICKELBERG O.** Endless healing: TGF-beta, SMADs, and fibrosis. *FEBS Lett* 506:11-4; **2001**
- EITZMAN DT, McCoy RD, Zheng X, Fay WP, Shen T, Ginsburg D, Simon RH.** Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in transgenic mice that either lack or overexpress the murine plasminogen activator inhibitor-1 gene. *J Clin Invest* 97:232-7; **1996**

- FRIKKER, M. J., M. C. K. Lynch, H. Pontoppidan, R. S. Wison, M. A. Rie und E. M. Zappol.** The adult respiratory distress syndrome: aetiology, progression und survival. In: *Adult respiratory distress syndrome*, A. Artigas, F. Lemaire, P. M. Suter und E. M. Zappol (Eds.). London: Chirchill Livingstone: 3-7; **1992**
- FUCHIMUKAI, T., T. Fujiwara, A. Takahashi und G. Enhorning.** Artifical pulmonary surfactant inhibited by proteins. *Journal of applied physiology. Respiratory enviromental and exercise physiology* 62: 429-437; **1987**
- GIBBS DF, Shanley TP, Warner RL, Murphy HS, Varani J, Johnson KJ.** Role of matrix metalloproteinases in models of macrophage-dependent acute lung injury. Evidence for alveolar macrophages as source of proteinases. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20:1145-1154; **1999**
- GHOSH TK, Eis PS, Mullaney JM, Ebert CL, Gill DL.** Competetive, reversible and potent antagonism of inositol 1,4,5-triphosphate-activated calcium release by heparin. *J Biol Chem* 263:11075-9, **1988**
- GÜNTHER, A, Kalinowski M, Elssner A, Seeger W.** Clot-embedded natural surfactant: kinetics of fibrinolysis and surface activity. *Am J Physiol* 267:L618-24; **1994**
- GÜNTHER, A., P. Markart, M. Kalinowski, C. Ruppert, F. Grimminger and W. Seeger.** Cleavage of surfactant-incorporating fibrin by different fibrinolytic agents: kinetics of lysis and rescue of surface activity. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 21:738-745; **1999**
- GÜNTHER, A., Mosavi P, Ruppert C, Heinemann S, Temmesfeld B, Velcovsky HG, Morr H, Grimminger F, Walmrath D, Seeger W.** Enhanced tissue factor pathway activity and fibrin turnover in the alveolar compartment of patients with interstitial lung disease. *Thromb Haemost* 83:853-60; **2000a**
- GÜNTHER, A., P. Mosavi, S. Heinemann, C. Ruppert, H. Muth, P. Markart, F. Grimminger, D. Walmrath, B. Temmesfeld-Wollbrück, W. Seeger.** Alveolar fibrin formation due to enhanced procoagulant and fibrinolytic capacities in severe pneumonia – comparison to ARDS. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161:454-62; **2000b**
- GÜNTHER, A., R. Schmidt, F. Nix, M. Yabut-Perez, C. Guth, S. Rosseau, C. Siebert, F. Grimminger, H. Morr, and H.G. Velcovsky.** Surfactant abnormalities in idiopathic pulmonary fibrosis, hypersensitivity pneumonitis and sarcoidosis. *Eur. Respir. J.* 14:565-573; **1999**.
- GRAY, A.J., J.E. Bishop, J.T. Reeves, R.P. Mecham, and G.J. Laurent.** Partially degraded fibrin(ogen) stimulates fibroblast proliferation in vitro. *Am. J. Respir. Mol. Cell. Biol.* 12:684-690; **1995**
- GREGORY, A. J., W. J. Longmoore, M. A. Moxley, J. A. Withsett, C. R. Reed, E. D. Flower, L. D. Hudson, J. R. Maunder, C. Crim and T. M. Hyers.** Surfactant chemical composition and physical activity in acute respiratory distress syndrome. *The journal of clinical investigations* 88: 1976-1981; **1991**
- GRIMMINGER, F., G. Becker und W. Seeger.** Hight Yield enzymatic conversion of intavaskular leukotrine A4 in Blood free perfused lungs. *J Immunol* 141: 2431; **1988**
- GROSS, T. J., R. H. Simon und R. G. Sitrin.** Tissue factor procoagulant expression by rat alveolar epithelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 6: 397-403; **1992**
- GURUJEYALAKSHMI, G., M.A. Hollinger, S. N. Giri.** Pirfenidone inhibits PDGF isoforms in bleomycin hamster model of lung fibrosis at the translational level. *Am. J. Physiol.* 276:L311-L318. **1999**
- HALLMANN, M., P. Maasilta. L. Kivisaari und K. Mattson.** Changes of surfactant in bronchoalveolar lavage fluid after hemithorax irradiation in patients with mesothelioma. *American review of respiratory diseases* 41: 998-1005; **1990**
- HALLMAN, M., R. Spragg, J. H. Harrell und H. M. Moser.** Evidence of lung surfactant failure in respiratory distress syndrome. *The journal of clinical investigations* 70: 673-683; **1982**
- HARDINGHAM TE, Fosang AJ.** Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J* 6:861-70, **1992**

HASDAY, J. D., P. R. Bachwich, J. P. Lynch und R. G. Sitrin. Procoagulant and plasminogen activator activity of bronchoalveolar fluid in patients with pulmonary sarcoidosis. *Experimental lung research* 14: 261-278; **1988**

HASLETT, C., A. S. Shen, D. C. Feldsien, D. Allen, P. M. Henson and R. M. Cherniack. ¹¹¹Indium-labeled neutrophil migration into the lungs of bleomycin-treated rabbits assessed noninvasively by external scintigraphy. *Am. Rev. Respir. Dis.* 140:756-763. **1989**

HERMANDES-RODRIGUES, N.A., N.K. Harrison, R.C: Chambers, A.J. Gray, A.M. Aotuhcott, R.M. du Bois, C.M. Black, M.F. Scully, and R.J. McAnulty. Role of thrombin in pulmonary fibrosis. *Lancet* 346:1071-1073; **1995**

HOLM B. A. und R. H. Notter. Effects of hemoglobin and cell membrane lipids on pulmonary surfactant activity. *Journal of applied physiology* 71: 317-321; **1991**

HORIUCHI, T., R. J. Mason, Y. Kuroki, R. M. Cherniack. Surface and tissue forces, surfactant protein A, and the phospholipid components of pulmonary surfactant in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141:1006-1013. **1990**

HOWELL DC, Goldsack NR, Marshall RP, McAnulty RJ, Starke R, Purdy G, Laurent GJ, Chambers RC. Direct thrombin inhibition reduces lung collagen, accumulation, and connective tissue growth factor mRNA levels in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*;159:1383–1395; **2001**

IDELL, S., K. Gonzalez, H. Bradford, C. K. MacAtur, A. M. Fein, R. J. Maunder, J. G. Garcia, D. E, Griffith, J. Weiland und T. R. Martin. Procoagulant activity in bronchoalveolar lavage in adult respiratory distress syndrom. Contribution of tissue factor associated with factor VII. *American review of respiratory diseases* 136: 1466-1474; **1987a**

IDELL, S., K. Gonzalez, C. K. MacAtur, C. Gillies, P. N. Walsch, J. McLarty und R. S. Trall. Bronchoalveolar procoagulant activity in bleomycin-induced lung injury in marmosets. Characterization and relationship to fibrin deposition and fibrosis. *American review of respiratory diseases* 136: 124-133; **1987b**

IDELL, S., K. K. Gonzales, C. K. MacArthur, C. Gillies, P. N. Walsh, J. McLarty, R. S. Thrall. Bronchoalveolar lavage procoagulant activity in bleomycin-induced lung injury in marmosets. Characterization and relationship to fibrin deposition and fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136:124-133. **1987c**

IDELL, S., K. K. James, C. Gillies, D. S. Fair und R. S. Trall. Abnormalities of pathways of fibrin turnover in lung lavage in rats with oleic and bleomycin-induced lung injury support alveolar fibrin deposition. *American journal of pathology* 135: 387-399; **1989a**

IDELL, S., K. K. James, E. G. Levin, B. S. Schwartz, M. Manchander, T. R. Martin, J. McLarty und D. S. Fair. Local abnormalities in coagulation and fibrinolytic pathways predispose to alveolar fibrin deposition in the adult respiratory distress syndrom. *Journal of clinical investigations* 84: 695-705; **1989b**

IDELL, S., K. B. König, D. S. Fair, T. R. Martin, J. McLarty und R. J. Maunder. Serial abnormalities of fibrin turnover in evolving adult respiratory distress syndrom. *American journal of pathology* 261: 240-248; **1991**

IDELL, S., J. Peters, K. K. James, D. S. Fair und J. J. Carlson. Local abnormalities of coagulation and fibrinolytic pathways that promote alveolar fibrin deposition in the lung baboons with diffuse alveolar damage. *Journal of clinical investigations* 84: 181-183; **1989c**

IDELL, S., B. T. Peterson, K. K. Gonzales, J. McLarty und D. S. Fair. Local abnormalities of coagulation and fibrinolysis and alveolar fibrin deposition in sheep with oleic acid-induced lung injury. *American review of respiratory diseases* 138: 1282-1294; **1988**

IMAI K, Dalal SS, Chen ES, Downey R, Schulman LL, Ginsburg M, D'Armiento J. Human collagenase (matrix metalloproteinase-1) expression in the lungs of patients with emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 163: 786-91; **2001**

ISHIHARA MM., Shklee PN, Yang Z, Liang W, Wie Z, Stack RJ, Holme K. Structural features in heparin which modulate specific biological activities mediated by basic fibroblast growth factor. *Glyco-biology* 4:451-458, 1994

IYER, S. N., J. S. Wild, M.J. Schiedt, D. M. Hyde, S. B. Margolin, S. N. Giri. Dietary intake of prifenidone ameliorates bleomycin-induced lung fibrosis in hamsters. *Year Book, Inc.* **1995**

JEFFRIES, A. L., G. Coates and H. O'Bordowich. Pulmonary epithelial permeability in hyaline membrane disease. *New england journal of medicine* 311: 1075-1080; **1984**

JONES, H., J. Schonfield, T. Krausz, A. Boobis and C. Haslett. Pulmonary fibrosis correlates with duration of tissue neutrophil activation. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 158(2): 620-628; **1998**

Kramer HJ, Schmidt R, Gunther A, Becker G, Suzuki Y, Seeger W. ELISA technique for quantification of surfactant protein B (SP-B) in bronchoalveolar lavage fluid. *Am J Respir Crit Care Med* 152:1540-4; **1995**

KOBAYASHI, T., K. Nitta, M. Ganzuka, S. Inui, G. Grossmann und B. Robertson. Inactivation of exogenous surfactant by pulmonary edema fluid. *Pediatric research* 29: 353-356; **1991**

KOHLER, D. Aerosols for systemic treatment. *Lung* 168:677-684; **1990**

LASKY, J. A., L. A. Ortiz, B. Tonthat, G. W. Hoyle, M. Corti, G. Athas, G. Lungarella, A. Brody, M. Friedman. Connective tissue growth factor mRNA expression is upregulated in bleomycin-induced lung fibrosis. *Am. J. Physiol.* 275:L365-L371. **1998**

LAZO, J. S. and S. M. Sebt. Bleomycin Cancer Chemotherapy and Biological Response Modifiers Annual 15; **1994**

LEGRAND C, Gilles C, Zham JM, Polette M, Buisson AC, Kaplan H, Birembaut P, Tournier JM. Airway epithelial cell migration dynamics: MMP-9 role in cell-extracellular matrix remodeling. *J Cell Biol* 146: 517-529; **1999**

LEMJABBAR H, Gosset P, Lechapt-Zalcman E, Franco-Montoya ML, Wallaert B, Harf A, Lafuma C. Overexpression of alveolar macrophage gelatinase B (MMP-9) in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: effects of steroid and immunosuppressive treatment. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20:903-13; **1999**

LEWIS, J. F. und A. H. Jobe. Surfactant and the adult respiratory distress syndrom. *American review of respiratory diseases* 147: 218-233; **1993**

Lider O, Mekori YA, Miller T, Bar-Tana R, Vlodavsky I, Baharav E, Cohen IR, Naparstek Y. Inhibition of T lymphocyte heparanase by heparin prevents T cell migration and T cell-mediated immunity; *Eur J Immunol* 20:493-9; **1990**

LOHMEYER, J, J Friedrich, F. Grimminger, U. Maus, R. Tenter, H. Morr, H. G. Velcovsky, W. Seeger, S. Rosseau. Expression of mucosa-related integrin alpha(e)beta(7) on alveolar T-cells in interstitial lung diseases. *Clin. Exp. Immunol.* 116:340-346; **1999**

MALKUSCH, W., B. Rehn, J. Bruch. Advantages of Sirius red staining for quantitative morphometric collagen measurements in lungs. *Exp. Lung Res.* 21:67-77; **1995**.

McCORMACK, F.X., T.E. King, D.R. Voelker, P.C. Robinson, and R.J. Mason. Idiopathic pulmonary fibrosis. Abnormalities in bronchoalveolar lavage content of surfactant protein A. *Am. Rev. Respir. Dis.* 144:160-166; **1991**

MATUSE Y, Y. Fukuchi, Y. Eto, H. Matsui, T. Hosoi, T. Oka, E. Ohaga, T. Nagase and H. Orimo. Expression of Immunoreactive and Bioactive Activin A Prozein in Adult Murine Lung after Bleomycin Treatment *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* Vol. 13. Pp.: 17-24; **1995**

MURAY, J. F. Mechanism of akut respiratory failure. *Am. Respir. Dis.* 115: 1071-1078; **1977**

NAGASE H, Woessner JF Jr. Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem* 274:21491-21494; **1999**

NAKSTADT B, Boye NP, Lyberg T. Procoagulant activities in human alveolar macrophages. *Eur J Respir Dis* 71:459-471; **1987**

NAKSTADT, B., N. P. Boye und T. Lyberg. Procoagulant activitis in human alveolar macrophages. *European journal of respiratory diseases* 71: 459-471; **1988**

NAKSTADT, B., T. Lyberg, O. H. Skojonsberg und N. P. Boye. Local activation of the coagulation and fibrinolysis system in lung disease. *Thrombosis research* 57: 827-838; **1990**

NIEMAN, G. F., D. Goyette, A. Paskanik und C. Bredenburg. Surfactand displacement by plasma lavage results in pulmonary edema. *Surgery* 107: 677-683; **1990**

OHBA, T., J.K. McDonald, R.M. Silver, C. Strange, E. Carwile LeRoy and A. Ludwicka. Scleroderma bronchoalveolar lavage fluid contains thrombin, a mediator of human lung fibroblast proliferation via induction of platelet-derived growth factor ? -receptor. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 10:405; **1994**

O`BRODOWICH, H. M., J. I. Weitz und F. Possmeyer. Effekt of fibrinogen degradation and lung groud substance on surfactant funktion. *Biologie of the neonate* 57: 325-333; **1990**

OLMAN, M. A., N. Mackman, C. L. Gladson, K. M. Moser, D. J. Loskutoff. Changes in procoagulant and fibrinolytic gene expression during bleomycin-induced lung injury in the mouse. *J. Clin. Invest.* 96:1621-1630. **1995**

OLMAN, M.A., W.L. Simmons, D.J. Pollman, A.Y. Loftis, A. Bini, E.J. Miller, G.M. Fuller, and K.E. Riviera. Polymerization of fibrinogen in murine bleomycin-induced lung injury. *Am. J. Physiol.* 271:L519-L526; **1996**

OSANAI, K., K. Takahashi, S. Sato, K. Iwabuchi, K. Ohtake, M. Sata, and S. Yasui. Changes of lung surfactant and pressure-volume curve in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J. Appl. Physiol.* 70:1300-1308; **1991**

PIGUET, P. F. and Ch Vesin. Pulmonary platelet trapping induced by bleomycin: correlation with fibrosis and involvement of the $\beta 2$ integrins. *Int. J. Exp. Path* 75: 321-328; **1994**

PIGUET, P. F., S. Haufman, C. Barazzzone, M. Muller, B. Ryffel, H. P. Eugster. Resistance of TNF/LT alpha double deficient mice to bleomycin-induced fibrosis. *Int. J. Exp. Pathol.* 78:43-48. **1997**

PIGUET, P.F., G.Y. Van, and J. Guo. Heparin attenuates bleomycin but not silica-induced pulmonary fibrosis in mice: possible relationship with involvement of myofibroblasts in bleomycin, and fibroblasts in silica-induced fibrosis. *Int. J. Exp. Pathol.* 77:155-161; **1996**

PISON, U., W. Seeger, R. Buchhorn, T Joka, M. Brand, U. Obertacke, H. Neuhof und K. P. Schmit-Neuerburg. Surfactant abnormlties in patients with respiratory failure after multiple trauma. *American review of Respiratory disease* 140: 1033-1039; **1989**

ROBINSON, P.C., L.C. Watters, T.E. King, and R.J. Mason. Idiopathic pulmonary fibrosis. Abnormalities in bronchoalveolar lavage fluid phospholipids. *Am. Rev. Respir. Dis.* 137:585-591; **1988**

RYAN, F., Y. Ghassibi und D. F. Linau. Effects of polymorphnuclear leukocytes upon pulmonary surfactant in vitro. *American journal of respiratory cell molecular biology* 4: 33-41; **1991**

SCHERMULY RT, Gunther A, Ermert M, Ermert L, Ghofrani HA, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W, Walmrath D. Conebulization of surfactant and urokinase restores gas exchange in perfused lungs with alveolar fibrin formation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280:L792-800: **2001**

SCHMIDT R, Ruppert C, Daum C, Seeger W, Grimminger F, Steinhilber W, Gunther A. An ELISA technique for quantification of surfactant apoprotein (SP-C) in bronchoalveolar lavage fluid. *Am J Respir Crit Care Med* 2001 Im Druck:

SCHWARTZ DA, Helmers RA, Galvin JR, Van Fossen DS, Frees KL, Dayton CS, Burmeister LF, Hunninghake GW. Determinants of survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 149:450-4; **1994**

SEEGER, W., Akutes Lungenversagen-ARDS, *Manomale pneumologikum* (Herausgeber D. Nolte), Bd. 1-11, Dustri Verlag Dr. Karl Feistle, München: 1-45; **1992a**

SEEGER, W., A. Günther und C. Thede. Differential sensitivity of fibrinogen inhibition of SP-C- vs. SP-B-based surfactant. *American journal Physiology* 262 (*Lung cellular and Molecular biology*): 286-291; **1992b**

SEEGER, W., C Grube und A. Günther. Proteolytic cleavage of fibrinogen amplification of its surfactant inhibitory capacity. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 9: 239-247; **1993a**

SEEGER, W., C Grube, A. Günther und R. Schmidt. Surfactant inhibition by plasma proteins: differential sensitivity of various surfactant preparations. *European respiratory journal* 6: 971-977; **1993b**

SEEGER, W., Elssner A, Gunther A, Kramer HJ, Kalinowski HO. Lung surfactant phospholipids associate with polymerizing fibrin: loss of surface activity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9:213-20; **1993**

SEEGER, W., A. Günther, H. W. Walmrath, F. Grimminger und H. G. Lasch. Alveolar surfactant and adult respiratory distress syndrome: pathogenic role and therapeutic perspectives. *The clinical investigator* 71: 177-190; **1993c**

SEEGER, W, T. Hansen, R. Rössig, T. Schmel, H. Schütte, H. J. Krämer, D. Walmrath, N. Weissmann, F. Grimminger und N. Suttrop. Hydrogen peroxide-induced increase in lung endothelial and epithelial permeability – effect of adenylate cyclase stimulation and phosphodiesterase inhibition. *Microvasc Res*; **1995**

SEEGER, W., J. Hübel, K. Klapettek, U. Pison, U. Obertacke, T. Joka und L. Roka. Procoagulant activity in bronchoalveolar lavage of severely traumatized patients: relation to the development of acute respiratory distress. *Thrombosis research* 91: 45-52; **1991**

SEEGER, W. H. Lepper, H. R. Wolf und H. Neuhof. Alterations of alveolar surfactant after exposure to oxidative stress and to oxygenated and native arachidonic acid in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta* 835:58-67; **1985**

SEEGER, W. D. Walmrath und F. Grimminger. Acute respiratory distress syndrome-model systems using the isolated perfused rabbit lung. In *Oxygen radicals in biological systems, Part C L Packer, editor (a volume of Methods Enzymol, J. N. Abelson and M. I. Simon, editors) Academic Press, inc Orlando* 233: 549; **1994**

SEEGER, W. D. Walmrath, M. Menger und H. Neuhof. Increased vascular permeability after arachidonic acid and hydrostatic challenge. *J. Appl Physiol* 61: 1781- 1789; **1986**

SEIDENFELD, J. J., D. F. Pohl, R. C. Bell, G. H. Harris, W. G. Johanson. Incidence, side and outcome of infections in patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am. Respir. Dis.* 134: 12-16. **1986**

SELMAN, M., Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. *Respir Res* :2002, in press.

SELMAN, M., Ruiz V, Cabrera S, Segura L, Ramirez R, Barrios R, Pardo A. TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:L562-74: **2000**

- SHAHZEID, I S., P.K. Jefferey, G. J. Laurent, R. J. McAnulty.** Increased type I procollagen mRNA transcripts in the lungs of mice during the development of bleomycin-induced fibrosis. *Eur. Respir. J.* 7:1938-1943. **1994**
- SLOANE, P. J. , M. C. Gee, J. E. Gottlieb, K. H. Albertine, S. P. Peters, J. R. Bruns, G. Macai do und J. E. Fish.** A multicenter registry of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am. Ref. Respir Dis.* 146: 419-426; **1992**
- SPECKS, U., A. Nerlich, T. V. Colby, I. Wiest, R. Timpl.** Increased expression of type IV collagen in lung fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151:1956-1964. **1995**
- SUGA, M., Iyonaga K, Okamoto T, Gushima Y, Miyakawa H, Akaike T, Ando M.** Characteristic elevation of matrix metalloproteinase activity in idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 162:1949-56; **2000**
- TANI, K., Yasuoka S, Ogushi F, Asada K, Fujisawa K, Ozaki T, Sano N, Ogura T.** Thrombin enhances lung fibroblast proliferation in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5:34-40; **1991**
- TAYLOR, F. B. and M. E. Abrams.** Effect of surface lipoprotein on clotting and fibrinolysis, and of fibronogen on surface tension of surface active lipoprotein. *American journal of medicine* 40: 346 350; **1966**
- TEMELKOVSKI, J., R. K. Kumar, S. E. Maronese.** Enhanced production of an EGF-like growth factor by parenchymal macrophages following bleomycin-induced pulmonary injury. *Exp. Lung Res.* 23:377-391. **1997**
- TIMOTHY, D. B., A. Darrel, Ch. G. Leslie, P. M. Henson and R. M. Cherniack.** Bleomycin-induced Lung Injury in the Rabbit. *Am. Rev. Respir. Dis.* 132: 590-595; **1985**
- THRALL, R. S., J. R. McCormick, R. M. Jack, R. A. McReynolds, P. A. Ward.** Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat. Inhibition by indomethacin. *Am. J. Pathol.* 95:117-130. **1979**
- THRALL, R. S., C. L. Swendsen, T. H. Shannon, C. A. Kennedy, D. S. Frederick, M. F. Grunze, S. B. Sulavik.** Correlations of changes in pulmonary surfactant phospholipids with compliance in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136:113-118. **1987**
- VENKITARAMAN, A. R., J. E. Baatz, J. A. Witsett, S. B. Hall und R. H. Notter.** Biophysical inhibition of synthetic phospholipid-lung surfactant apoprotein mixtures by plasma proteins. *Chemistry and physics of lipids* 57: 49-57; **1990**
- VISCARDI, R. M., K. Broderick, C. J. Sun, A. J. Yale, A. Hessamfahr, V. Tacick, K. C. Burke, K. B. König und S. Idell.** Disordered pathways of fibrin turnover in lung lavage of premature infants with respiratory distress syndrom. *American review of respiratory diseases* 146: 492-499; **1992**
- VILLAR, J und A. S. Slutsky.** The incidence of the adult respiratory distress syndrome *Am. Ref. Respir Dis.* 140: 814- 816; **1989**
- WANGENSTEEN, D., R. Yankovich, J. Hoidal, D. Niewoehner.** Bleomycin-induced changes in pulmonary microvascular albumin permeability and extravascular albumine space. *Am. Rev. Respir. Dis.* 127:204-208. **1983**
- WEBSTER, N. R., A. T. Cohen und J. F. Nunn.** Adult respiratory distress syndrome-How many cases in the UK? *Anesthesia* 43: 923-926; **1988**
- WILD, J. S., Dallas M. Hyde and S. N. Giri.** Dose and Regimen Effects of Poly ICLC an Interferon Inducer, in a Multidose Bleomycin Model of Interstitial Pulmonary Fibrosis. *Pharmacology and Toxicology* 75: 42-48, **1994**

WISPE, J. R., J. C. Clark, B. B. Warner, D. Fajardo, W. E. Hull, R. B. Holzman und J. A. Whitsett. Tumor necrosis factor-alpha inhibits expression of pulmonary surfactant orotein. *The journal of clinical investigations* 86: 1954-1960; **1990**

YASUI H, Gabazza EC, Tamaki S, Kobayashi T, Hataji O, Yuda H, Shimizu S, Suzuki K, Adachi Y, Taguchi O. Intratracheal administration of activated protein C inhibits bleomycin-induced lung fibrosis in the mouse. *Am J Respir Crit Care Med* 163:1660–1668; **2001**

ZHANG, K., M. Gharaee-Kermani, B. McGarry, D. Remick, S. H. Phan. TNF-alpha mediated lung cytokine networking and eosinophil recruitment in pulmonary fibrosis. *J. Immunol.* 158:954-959. **1997**

10) Danksagung

Danken möchte ich zunächst Frau Karin Quanz, MTA an der Justus Liebig Universität für die liebevolle Unterstützung, ohne deren technisches Know-how (welches sie weitergab), Ihren Rat und Tat, diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Des weiteren Herrn Dr. med. Andreas Günther, welcher die Arbeit intensiv betreute, geistige Anregungen gab und immer Zeit für noch offenstehende Fragen oder Diskussionen hatte.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Werner Seeger, welcher mir in seiner Arbeitsgruppe diese Arbeit ermöglicht hat. Er war jederzeit bei noch offenen Fragen mit hilfreichen Diskussionen zur Stelle.

Ich danke auch Frau Sabine Heinemann, welche die gewonnenen Proben sorgfältig weiterverarbeitete und bei offen Problemen gerne weiterhalf.

Frau Dr. M. Ermert und Herr Dr. med. L. Ermert, danke ich, für die Hilfe und Unterstützung bei den histologischen Untersuchungen.

Herr Dr. med. R. Breithecker danke ich für die HRCT's und deren Auswertung.

Meiner Frau Heike gilt besonderer Dank, da sie mich immer mit viel Liebe unterstützte.

11) Lebenslauf

Name : Friedemann, Norbert, Gregor, Ulrich Lübke

Wohnort : Rathausplatz 23, 35463 Fernwald/ Steinbach

Geburtsdatum: 03.08.1959

Verheiratet seit dem 07.10.93. in Lüdenscheid, mit Frau Heike Lübke, geb. Mandt am 26.02.1964.

Kinder aus dieser Ehe: Lukas, Rene, Norbert Lübke geb. am 26.03.94., Jonas, Jörg geb. am 04.05.95.

Vater : Dr. med. Norbert Lübke, Arzt.

Mutter: Maieli geb. Roser aus Stuttgart, Hausfrau.

Von	1966-	1970	Volksschule Bierbaum
	70-	72	Gesamtschule Kierspe
	72-	75	Freie Waldorfschule Benefeld
	75-	77	Theodor Heuss-Realschule Lüdenscheid mit Abschluß
Vom	01.09.77-	30.08.80	Berufsausbildung als Tischler
	01.09.80-	31.03.81	Tätig als Tischler
	01.04.81-	30.06.82	Wehrpflichtiger
	01.07.82-	31.05.84	Tätig als Tischler
	01.06.84-	06.11.85	Tätig als Tischler (Stadttheater Gießen).
	07.11.85-	01.11.86	Arbeitslos
	26.08.84-	11.12.87	Schüler des Abendgymnasiums Gießen mit

Abschluß.

	22.03.88-	22.10.93	Ordentlicher Student der Uni Gießen Studiengang Humanmedizin
	25.10.93-	23.11.94	Ordentlicher Student der Humanmedizin an der Uni-Bonn mit Ableistung meines Pj.
	01.01.95-	30.06.96	AiP, Innere Abtlg. I im KKH- Lüdenscheid
	01.07.96-	24.11.96	arbeitslos
	25.11.96-	30.11.96	Praxisvertretung bei Drs. N. und M. Cramer, Ärzte für Allgemeinmedizin, Am Wall 1 in Plettenberg
	01.12.96	19.10.97	Arbeitslos, mit gelegentlichen Notarztdiensten
	20.10.97	31.07.99	Forschung im Lungenlabor bei Prof. Dr. med. Seeger an der Uniklinik Gießen, ab 01.10.98 als wissenschaftlicher Assistent.
	01.08.99	30.04.01	Weiterbildungsassistent in der Neurologischen Klinik Braunfels
Seit dem	01.05.01	-dato	Weiterbildungsassistent der Neurologie an der Neurologischen Klinik Weilmünster